

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1898-1899.

N° 3.

RECHERCHES

SUR LES

ORGANISMES MYCÉLIENS DES SOLUTIONS PHARMACEUTIQUES

ÉTUDES BIOLOGIQUES SUR LE *PENICILLIUM GLAUCUM*

THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE 22 JUILLET 1899

PAR

GUÉGUEN (Fernand-Pierre)

Né à Loudéac (Côtes-du-Nord), le 25 juillet 1872

PHARMACIEN DE 1^{re} CLASSE, LICENCIÉ ÈS SCIENCES NATURELLES
ANCIEN INTERNE, LAURÉAT DES HOPITAUX ET DE L'ÉCOLE DE PHARMACIE
PRÉPARATEUR A L'ÉCOLE DE PHARMACIE.

JURY { MM. GUIGNARD, président.
BEAUREGARD, professeur.
RADAIS, agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1899

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1898-1899.

N° 3.

RECHERCHES

SUR LES

ORGANISMES MYCÉLIENS DES SOLUTIONS PHARMACEUTIQUES

ÉTUDES BIOLOGIQUES SUR LE *PENICILLIUM GLAUCUM*

THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

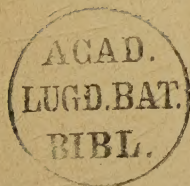
PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE 22 JUILLET 1899

PAR

GUÉGUEN (Fernand-Pierre)

Né à Loudéac (Côtes-du-Nord), le 25 juillet 1872

PHARMACIEN DE 1^{re} CLASSE, LICENCIÉ ÈS SCIENCES NATURELLES
ANCIEN INTERNE, LAURÉAT DES HOPITAUX ET DE L'ÉCOLE DE PHARMACIE
PRÉPARATEUR A L'ÉCOLE DE PHARMACIE.



JURY

MM. GUIGNARD, président.
BEAUREGARD, professeur.
RADAIS, agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1899

PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. G. PLANCHON, Directeur, O ,  I.
A. MILNE-EDWARDS, Assesseur, Membre de l'Institut, C ,  I.
E. MADOUÉ, Secrétaire,  I.

PROFESSEURS

MM. PLANCHON, O ,  I. Matière médicale.
A. MILNE-EDWARDS, membre
de l'Institut, C ,  I. Zoologie.
RICHE, O ,  I. Chimie minérale.
JUNGFLEISCH, ,  I. Chimie organique.
LE ROUX, ,  I. Physique.
BOUCHARDAT, ,  I. Hydrologie et Minéralogie
PRUNIER,  I. Pharmacie chimique.
MOISSAN, membre de l'Insti-
tut, ,  I. Toxicologie.
GUIGNARD, ,  I, membre de
l'Institut Botanique générale.
VILLIERS-MORIAMÉ,  I. Chimie analytique.
BOURQUELOT,  I. Pharmacie galénique.
BEAUREGARD, ,  I. Cryptogamie.

Directeur et professeur honoraire :

M. CHATIN, Membre de l'Institut, O ,  I.

Professeurs honoraires :

MM. BERTHELOT, Membre de l'Institut, G. C. ,  I.
MARCHAND,  I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

LEIDIÉ,  I.		MM. BERTHELOT,  A.
GAUTIER,  A.		RADAIS,  A.
OUVRARD,  I.		

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. GRIMBERT Chimie générale.
LEXTREIT,  I. Chimie analytique.
PERROT,  A. Micrographie.
QUESNEVILLE,  I. Physique.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. CHASTAING,  I.

Bibliothécaire : M. DORVEAUX,  I.

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUIGNARD,

Membre de l'Institut.

Hommage respectueux et témoignage de vive gratitude.

RECHERCHES

SUR

les organismes mycéliens des solutions pharmaceutiques

ÉTUDES BIOLOGIQUES SUR le *Penicillium glaucum*,

Par M. F. GUÉGUEN.

INTRODUCTION.

Les végétations cryptogamiques que l'on rencontre dans les eaux distillées et les solutions salines des laboratoire ont été l'objet de nombreux travaux. Depuis Biasoletto, plusieurs auteurs ont décrit avec détails l'organisation des amas filamenteux et des productions nébuleuses qui se développent dans les hydrolats et le solutés.

Les organismes qui apparaissent dans ces conditions appartiennent aux deux grandes classes des Champignons et des Algues, ces dernières consistant surtout en Bactériacées et Palmellacées. On en trouve l'énumération et la description dans un récent travail (1).

Parmi les Champignons décrits dans ce dernier mémoire, on rencontre un assez grand nombre de formes conidiennes qui ne constituent pas des genres et des espèces autonomes, mais que l'étude de leur développement fera considérer sans doute comme faisant partie du cycle évolutif des Champignons supérieurs. Il est certaines de ces formes, en particulier, dont le nom revient souvent dans les ouvrages qui traitent des altérations des liquides médicamenteux ; ce sont les formes filamenteuses que Biasoletto a décrit en 1832 sous le nom générique d'*Hygrocrocis*. (2)

(1) Barnouvin. — *Organismes des hydrolats et des solutés*, Paris, 1898.
— Biasoletto. *Die alcune alghe microscopiche*, Trieste, 1832.

(2) Le genre *Hygrocrocis* a été créé par C. A. Agårdh (*Systema algarum*, Lundae, 1824), pour des organismes mycéliens dont il décrit neuf espèces.

La diversité de composition des milieux liquides dans lesquels on rencontre ces plantes fait supposer *a priori* qu'elles doivent se rattacher à un ou plusieurs champignons très-répandus, et doués d'une grande facilité d'adaptation aux conditions de milieu. Nous nous sommes proposé de rechercher à quel genre bien connu pouvaient se rapporter les *Hygrocrocis*, puis, ce résultat obtenu, nous avons cherché à déterminer les causes de variations morphologiques de ces plantes.

Pour faciliter notre tâche, nous nous sommes adressés seulement aux *Hygrocrocis* des solutions, à l'exclusion de ceux des eaux distillées. En opérant ainsi, nous avons eu l'avantage de connaître la composition exacte des milieux où s'étaient développés nos organismes, et de pouvoir, en faisant varier la composition de ces liquides, suivre parallèlement les changements apportés dans l'organisation de la plante.

Dans un premier chapitre, nous avons exposé les méthodes de travail qui nous ont servi dans le cours de nos recherches, nous réservant, dans quelques cas particuliers, de revenir avec plus de précision sur certains détails de technique nécessités par des circonstances particulières.

La description des formes mycéliennes rencontrées dans les diverses solutions que nous avons pu examiner fait l'objet de notre second chapitre. A la suite de chaque description, nous avons mentionné les résultats auxquels nous ont conduits les essais de culture sur les milieux solides. Nous avons ainsi constaté que les *Hygrocrocis* se rattachaient à deux ou trois genres très répandus, et que la plupart du temps, les hyphes conidiennes obtenues par la culture appartenaient au *Penicillium glaucum* (1).

Cette constatation faite, le problème du polymorphisme de

(1) Nous avons communiqué ce résultat de nos observations à la Société mycologique de France (Compte-rendu de la séance du 7 avril 1898), D'autre part, M. L. Planchon (Séance de la Société de Pharmacie du 4 mai, et note dans le J. de Ph. et de Ch., 6^e série, T. VII, 1^{er} juin 1893), et M. J. Beauverie (*Hygrocrocis* et *Penicillium glaucum* ; mémoire lu devant la Société botanique de Lyon, le 11 mai 1898) sont arrivés aux mêmes conclusions.

nos organismes se réduisait à étudier le cycle évolutif du *Penicillium* dans les conditions particulières où nous l'avons rencontré, c'est à-dire dans les milieux liquides. Comme des formes presque semblables habitaient des milieux de composition chimique très-différente, nous étions fondé à croire que les différences morphologiques observées étaient liées surtout à des variations communes à ces divers milieux, c'est-à-dire à la réaction acide ou alcaline, à la concentration, à la toxicité plus ou moins grande des substances dissoutes pour l'organisme qui s'y développait. Etudier l'importance relative de ces différents facteurs sur la constitution du thalle du *Penicillium glaucum*, et l'action sur le Champignon de différents milieux sur lesquels on le rencontre le plus habituellement, c'est là l'objet de notre troisième et de notre quatrième chapitres.

Dans le chapitre suivant, nous résumons les recherches que nous avons faites sur l'action des antiseptiques sur le *Penicillium*.

Nous terminerons par l'étude des modifications apportées par les changements de milieu sur le contenu cellulaire du *Penicillium glaucum*, en comparant la cellule de la plante normalement et vigoureusement développée avec celle du même champignon placé dans des conditions propres à retarder sa croissance.

I. — Technique générale.

Les organismes mycéliens dont l'étude fait l'objet de ce chapitre se rencontrant dans tous les laboratoires et dans toutes les officines, et par conséquent dans des conditions climato-logiques aussi variables que possible, pouvaient être très-différents suivant la provenance des solutions où ils s'étaient développés. Aussi avons-nous pris soin de nous procurer des échantillons de diverses origines. Nos essais ont porté sur des solutions provenant de diverses pharmacies de campagne, et de plusieurs laboratoires de Paris et d'autres villes. Les plus grandes précautions ont été prises pour éviter la contamina-

tion, à un moment quelconque, des échantillons soumis à nos essais.

Toutes les fois qu'il ne nous a pas été possible d'apporter nous-même à notre laboratoire le flacon renfermant le liquide au sein duquel flottaient des mycéliums, nous avons fait faire le prélèvement dans les vases à l'aide de pipettes ou de fils de fer stérilisés. Les filaments ainsi pêchés étaient aussitôt déposés dans de petits tubes lavés à l'eau bouillante, puis fermés imparfaitement à l'aide de bouchons flambés, et enfin refroidis. On emplissait les tubes avec le liquide même où le prélèvement avait été fait, puis on enfonçait et cachetait le bouchon.

Ces prélèvements étaient opérés après essuyage et flambage du col du flacon ainsi que du bouchon.

Pour étudier ces organismes, nous commençons par recueillir aseptiquement au sein du liquide, à l'aide d'une petite spatule de platine flambée, des parcelles de filaments, qui étaient aussitôt ensemencées sur les divers milieux nutritifs, à la fois en tubes ou flacons et en cultures cellulaires.

Une touffe assez grosse de mycélium, captée avec les mêmes précautions, était portée dans un verre de montre plein d'eau distillée, et divisée en fragments, pour être soumise à l'action de divers réactifs (acide osmique, orcanette acétique, eau iodée, etc.)

CULTURES EN GRANDE SURFACE. — Les milieux sur lesquels nous avons cultivé nos organismes sont les suivants :

Pommes de terre, carottes, topinambours, préparés à la manière ordinaire dans des tubes à essai et stérilisés à 120°.

Pommes de terre acides. — Lorsque les filaments mycéliens étaient accompagnés d'une trop grande abondance de bactéries qui auraient pu gêner leur développement sur les milieux neutres, nous nous sommes bien trouvé de l'emploi de pommes de terre rendues acides. Pour cela, les morceaux prismatiques de pomme de terre crue étaient bouillis pendant cinq minutes dans une solution d'acide lactique à 1 pour cent, puis mis dans des tubes avec un peu de la solution, et stérilisés à 120°.

Blanc d'œuf cuit. — Du blanc d'œuf, passé à travers une toile pour le rendre plus homogène et en séparer les membranes,

était réparti dans des tubes inclinés, et chauffé à 100° pendant 10 minutes, trois jours de suite. Ce milieu ayant une grande tendance à se dessécher rapidement ne doit être préparé que peu de jours à l'avance, et mis dans des tubes hermétiquement bouchés.

Empois d'amidon. — L'amidon était délayé dans cinq fois son poids d'eau distillée, puis versé dans des matras d'Erlenmeyer à l'aide d'un entonnoir à longue douille, et enfin chauffé au bain-marie à 100° pendant cinq minutes trois jours de suite.

Liquide de Raulin rendu solide par addition de $\frac{1}{30}$ de son poids de gélatine, et porté à l'ébullition dans le vase de culture préalablement bouché à l'ouate.

Solutions médicamenteuses gélatinées à $\frac{1}{20}$ ou $\frac{1}{30}$ suivant le cas.

Liquide de Raulin stérilisé par ébullition dans le matras même où il était utilisé.

Liquide de Raulin neutre. — Liquide dans lequel l'acide tartrique était remplacé par un poids équivalent de tartrate neutre de potasse, le carbonate de magnésie par un poids équivalent de sulfate, et le carbonate de potasse supprimé.

Liquide de Raulin alcalin. — Liquide précédent, dans lequel on ajoutait des quantités variables de carbonate de potasse.

Ce liquide, de même que le précédent, était stérilisé par deux ébullitions à vingt-quatre heures d'intervalle, les réactions neutre et alcaline favorisant l'envahissement par les bactéries.

CULTURES CELLULAIRES. — Pour suivre sous le microscope le développement de nos moisissures, nous avons eu recours aux cultures en cellules, qui ont donné déjà de si heureux résultats entre les mains de divers observateurs.

Nos cultures ont été effectuées à la température ordinaire, en conservant nos porte-objets, pendant l'intervalle des observations, soit sur une étagère recouverte d'une cloche, soit sur les platines mêmes des trois microscopes employés pour ces recherches. Nous nous sommes servi exclusivement de la chambre humide de MM. Van Tieghem et Le Monnier (1). Le plus

(1) Van Tieghem et Le Monnier. — *Recherches sur les Mucorinées* Ann. Sc. Nat. 1872 et 1875).

souvent, nous avons employé des milieux solides, ce qui nous permettait d'étaler le sol nutritif d'une manière uniforme sur la lamelle, de façon à éviter les gouttes convexes qui rendent impossible l'emploi de forts grossissements. Nous pouvions facilement, en opérant ainsi, mettre dans la chambre humide une particule nutritive aussi petite que nous le voulions, de manière à épuiser rapidement le substratum, circonstance utile en certains cas. Le dernier avantage des milieux solides était de nous permettre de transporter les chambres humides, les organismes ne pouvant se déplacer, et pouvant être par suite facilement repérés.

Le milieu solide dont nous nous sommes servi le plus souvent (liquide de Raulin gélatinisé à $\frac{1}{30}$) était réparti après sa préparation dans de très-petits tubes à essai bouchés à l'ouate, et recouverts d'un capuchon de caoutchouc. Le contenu de chaque tube servait pour une série d'ensemencements.

Pour faire une culture, une cellule porte-objet, garnie d'une ou deux gouttes d'eau, était recouverte d'une lamelle très-mince, préalablement lavée à l'alcool et flambée. A la face inférieure de celle-ci on déposait un petit fragment de gélatine, prélevé aseptiquement dans un tube. A l'aide d'un fil de platine chauffé, on étalait la gélatine sans retourner la lamelle. L'ensemencement était fait suivant les règles ordinaires, à l'aide d'un fil de platine dont on effleurait la surface de la gélatine. L'adhérence de la lamelle était obtenue à l'aide d'huile de ricin qui se laissait facilement enlever par l'alcool absolu, lorsqu'on voulait conserver la préparation en milieu aqueux ou glycérimé.

FIXATION, COLORATION ET CONSERVATION DES PRÉPARATIONS.— Les procédés variaient suivant que les préparations étaient extemporanées ou définitives.

Pour les préparations provisoires, nous avons eu recours exclusivement à l'examen dans l'eau iodée (*solution de Gram*). Ce réactif, outre qu'il fixe modérément mais d'une manière suffisante pour un examen immédiat, colore le protoplasma des filaments en jaune plus ou moins foncé, et permet d'apercevoir avec beaucoup de netteté les cloisons cellulaires. En outre, ce réactif nous renseignait sur la présence, parfois constatée, d'amidon dans la membrane des cellules.

Les préparations destinées à la conservation étaient faites en dissociant simplement les filaments dans une goutte de liquide de *Ripart et Petit*, recouvrant d'une lamelle et bordant à la cire. Nous avons trouvé que dans ce cas la liqueur de *Ripart* fixe suffisamment, et qu'elle n'a pas, comme l'alcool employé par la majorité des auteurs, l'inconvénient de contracter les cellules d'une manière fâcheuse (1).

Pour conserver les cultures cellulaires, nous avons eu cependant recours à ce fixateur, ainsi qu'à la coloration par la vésuvine. La lamelle était ensuite lavée avec précaution, et déposée dans une goutte de gélatine glycinée fondue.

Dans le chapitre qui a trait à l'étude du contenu cellulaire, nous exposerons les méthodes de coloration et d'observation que nous avons employé, et dont le détail ne saurait trouver place ici.

II. — Morphologie et nature des mycéliums de quelques solutions.

La solution médicamenteuse qui a été le mieux étudiée au point de vue des organismes qu'on y trouve est la LIQUEUR DE FOWLER. L'un des organismes qui s'y développent a fait l'objet, il y a déjà longtemps, d'un travail de M. le Professeur Marchand (2), qui l'a très complètement étudié au point de vue morphologique, et lui a donné le nom d'*Hygrocrocis arsenicus*.

Nous ne reviendrons pas sur cette description, faisant remarquer seulement que nous n'avons pu observer, dans tous les échantillons que nous avons eus entre les mains, que des formes submergées. (Pl. XIII, fig. 3.)

Afin d'établir la nature spécifique de ce végétal, nous l'avons soumis à la culture sur divers milieux.

(1) L'acide acétique cristallisable, indiqué par A. N. Berlèse pour éviter la désarticulation des conidies, ne nous a pas donné les résultats que nous en attendions. (A. N. Berlèse, *Bull. Soc. Mycol. Fr.*, VIII, 1892, p. 94).

(2) L. Marchand (*C. R. Ac. Sc.* nov 1878. — *Bot. Cryptog.*, 1883, p. 187).

Sur *pomme de terre*, après trois jours, chaque coussinet noirâtre se recouvre d'un petit tomentueux blanc, qui, dès le quatrième jour commence à présenter quelques points verdâtres. Cette culture progresse rapidement; de blanche qu'elle était d'abord, elle verdit, en même temps qu'elle envahit concentriquement la pomme de terre, au niveau du point d'inoculation.

Les parties vertes de la culture sont formées de pinceaux conidifères de *Penicillium glaucum*.

Sur *blanc d'œuf cuit*, les cultures, après le second jour, donnent des taches d'un brun-sépia, bordées de filaments très ténus, blancs d'abord, puis d'un gris noirâtre, irradiant peu-à-peu autour du centre. Examinés au microscope, ces filaments ont l'aspect de tubes noirâtres, cylindriques, avec cloisons de distance en distance (cellules de 6 à 7 $\approx$ 1 environ).

Quelques jours après, ce mycélium s'est sensiblement accru, en liquéfiant l'albumine sur son passage. Quelques-uns de ses rameaux continuent à ramper dans le sol nutritif; d'autres se sont dressés à la surface, sous forme d'un enduit velouté. Les branches dressées sont formées de filaments de diverses longueurs, qui à leur sommet se ramifient et s'étranglent en articles ovoïdes, bruns, souvent coupés en travers par une cloison mince, et formant par leur assemblage des rameaux insérés à angle droit les uns sur les autres.

Les cellules ovoïdes situées au sommet des branches tombent à la surface du milieu nutritif, et y germent à leur tour.

Tous ces caractères appartiennent au genre *Hormodendron*, sur lequel nous aurons à revenir plus loin.

Après une quinzaine de jours, on voit apparaître par places, mêlés à ces filaments noirs, des appareils conidiens ordinaires de *Penicillium glaucum*, dont les conidies apparaissent ici blanches où à peine verdâtres. Cette modification de couleur est sans importance, car nous verrons plus loin que le *Penicillium* ne verdit pas dans certaines conditions. Du reste, les conidies de celui-ci, transportées sur liquide de Raulin, donnent le *Penicillium glaucum* avec tous ses caractères, y compris la coloration.

Nous avons tenté de cultiver l'*Hygroscopicus arsenicus* sur liquide de Raulin. Au bout du douzième jour, chacun des thalles

noirs est entouré d'une auréole de filaments blancs, dont les articles sont en continuité avec le thalle primitif. Ces filaments, d'abord à cellules cylindriques avec cloisons espacées comme les hyphes rampantes du *Penicillium*, ne tardent pas à bourgeonner activement, puis se désarticulent à leur extrémité en cellules ovoïdes ressemblant à celles de la forme *Hormodendron*. Plusieurs de ces cellules, une fois détachées, se mettent à germer à leur tour, et poussent un long filament semblable à celui dont elles proviennent. On peut conclure de ces expériences que l'*Hygrocrocis* est formé de l'association du *Penicillium glaucum* et d'un *Hormodendron*, que leur inégalité de développement sur divers milieux nutritifs permettrait de séparer, en donnant la prédominance à l'une ou à l'autre forme.

Après avoir déterminé la nature véritable de l'*Hygrocrocis arsenicus*, nous avons cherché à établir quelle était la forme (*Hormodendron*, ou *Penicillium*) qui lui permettait de se développer le plus rapidement dans la liqueur de Fowler. Pour cela, nous avonsensemencé le *Penicillium*, les *Hormodendron*, et des fragments de filaments dans du liquide arsenical stérilisé, à la fois en flacons d'Erlenmeyer et en cellules.

Nous avons remarqué que les conidies de *Penicillium* n'avaient pas encore germé après douze jours ; elles ne commençaient à pousser des tubes que du vingtième au trentième jour, et encore la plupart restaient-elles inertes. Même après sept mois, nous n'avons vu, dans le liquide, aucun point noir d'*Hygrocrocis*. C'est à peine si après ce temps quelques-unes des conidies ont donné de maigres thalles, semés de rares hyphes d'un *Penicillium* à conidies grises de 4 μ .

Les cellules de la forme *Hormodendron* se sont gonflées en prenant la forme d'un huit de chiffre due à la résistance de la cloison médiane ; mais elles se sont refusées à germer, même au bout de deux semaines. Peut-être étaient-elles tuées par endosmose.

Les filaments noirs se sont comportés comme dans le liquide de Raulin, en formant des auréoles hyalines d'hyphes à croissance lente.

Enfin, les fragments blancs de *Penicillium* ont paru y pousser plus facilement.

La difficulté que nous avons eue à obtenir des germinations de conidies sur la liqueur de Fowler semble faire croire que ce n'est pas par la voie de l'air que l'inoculation se fait. Elle serait peut-être due le plus souvent à l'addition de filaments mycéliens qui peuvent y arriver lors de la préparation de la liqueur, lorsqu'après y avoir fait dissoudre l'acide arsénieux et le carbonate de potasse à l'ébullition, on laisse refroidir avant de compléter le volume final avec de l'eau distillée (1).

BROMURE DE POTASSIUM (à $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{10}$, etc.). Dans toutes les solutions que nous avons pu examiner, et dont l'une était vieille de plus de deux ans, nous avons constamment rencontré les mêmes mycéliums, sous forme de touffes d'un vert brun, d'autant plus foncées que le liquide était lui-même plus anciennement préparé. Dans une solution vieille d'un mois environ, les amas étaient vert-olive, se rapportant par tous leurs autres caractères à ceux des autres liquides (2). (Pl. XIII, *fig. 2*.)

Les mycéliums se présentent sous forme de petits paquets brunâtres ou olivâtres, les uns arrondis et suspendus au sein du liquide, les autres en forme de disques lenticulaires nageant à la surface, ou attachés aux parois du flacon. Dans les vieilles solutions, on rencontre aussi des flocons hyalins, les uns libres, les autres adhérant aux coussinets précédemment décrits. Les flocons libres, observés pendant plusieurs semaines, devenaient bientôt brunâtres à leur centre, et d'aspect semblable aux premiers, dont ils n'étaient par conséquent que des formes jeunes (3).

Sur *pomme de terre*, vers le troisième ou le quatrième jour, il se développe le long des stries d'inoculation des colonies to-

(1) J'ai rencontré à plusieurs reprises, dans la liqueur de Fowler, une petite levûre que l'on peut facilement utiliser à l'état de pureté. Les cellules sont oblongues et en voie de bourgeonnement actif dans la liqueur.

(2) Dans une solution qui avait été additionnée de sirop de sucre, nous avons rencontré tout-à-fait les mêmes formes, avec de grosses levûres à cellules presque rondes, dont la présence s'explique par celle du sucre.

(3) Barnouvin décrit dans la solution de Bromure de potassium au $\frac{1}{20}$ des formes filamenteuses blanches, ce qui est dû sans doute à ce qu'ils'est adressé à des solutions récemment préparées (quinze jours).

menteuses, d'un brun-olivâtre, formées d'éléments semblables à ceux fournis par l'*Hygrocrocis arsenicus* lors de l'ensemencement sur le blanc d'œuf cuit, donnant aussi par conséquent un *Hormodendron*.

Les cultures faites sur milieux liquides donnent également le même *Hormodendron*, qui ne tarde pas à envahir toute la masse du liquide de filaments noirâtres, en même temps que de nombreuses touffes mycéliennes s'accroissent aux parois du vase.

Lorsqu'au lieu de s'adresser à des solutions déjà anciennes on prend des liquides plus récemment préparés, on obtient sur les milieux de culture les mêmes phénomènes qu'avec l'*Hygrocrocis arsenicus*, c'est-à-dire l'*Hormodendron* accompagné de *Penicillium*.

ACÉTATE DE POTASSE A $\frac{1}{5}$ ET $\frac{1}{20}$ (Pl. XIII, fig. 1).— Les végétations se présentent sous la forme de touffes mycéliennes jaunâtres dans les solutions relativement récentes, brun-noirâtre dans les très vieilles solutions. Ces touffes ont la forme de petites sphères échinulées, de 5 à 7 millimètres de diamètre, quelquefois plus, ressemblant beaucoup à celles des solutions de bromure de potassium. Elles en diffèrent toutefois par leurs filaments plus raides et à parois cellulaires plus noires. Les colonies adhérentes à la paroi du flacon, au niveau de la surface du liquide, sont des *Hormodendron* semblables à ceux de la culture d'*Hygrocrocis arsenicus* sur blanc d'œuf; les touffes submergées sont des files de courts articles, interrompues de place en place par des cellules plus grosses et à contenu brun-foncé, comme l'*Hygrocrocis arsenicus* que nous avons pu étudier.

L'acétate de potasse nous a fourni un moyen de savoir de quelle manière se faisait la contamination des solutés.

A priori, il était naturel de penser que les filaments mycéliens provenaient de la chute de conidies ou de spores dans les liquides contenus dans les flacons en vidange. Toutefois, il fallait faire la preuve de cette supposition.

Ayant préparé des solutions d'acétate de potasse soigneusement filtrées, dans le but d'en faire des milieux de culture par gélatinisation, nous avons remarqué que ces solutions aban-

données à elles-mêmes, se troublaient au bout de peu de jours, et bientôt étaient le siège d'un abondant développement de flocons mycéliens. Cette facilité à se contaminer, bien plus grande que celle d'autres solutions telles que la liqueur de Fowler par exemple, nous a donné l'idée de faire desensemencements de *Penicillium glaucum* dans des solutions semblables, préalablement stérilisées.

Nous avons remarqué que dans deux échantillons placés dans des conditions identiques, mais l'un exposé à la contamination par l'air, l'autre ensemencé artificiellement, et bouché à l'ouate stérilisée, les choses se passaient de même.

Au bout d'une quinzaine de jours, la température étant de 12° à 16°, on commence à apercevoir dans le liquide de très-faibles flocons nuageux, surtout à la partie supérieure de celui qui était resté imparfaitement bouché (avec un cornet de papier à pointe ouverte et plongée dans le goulot). Cette prédominance de nuages à la surface était évidemment due au stationnement des conidies à ce niveau. Au bout de trois semaines, les nuages étaient devenus plus consistants ; ils commençaient à émerger à la surface, sous forme de disques d'un blanc mat supérieurement, d'un blanc jaunâtre dans la partie plongeante, et avec de longs filaments pendants.

Dans les parties profondes, les thalles avaient la forme de houppes hyalines, d'un blanc pur passant ensuite au blanc-jaunâtre. En observant les cultures de temps à autre, on remarque que les filaments des parties profondes paraissent brunir. Au bout de trois mois et demi environ, voici ce que l'on constate :

Les colonies flottantes sont toujours blanches par leur surface émergée. Elles sont brun-grisâtre dans les parties profondes, et même presque noires par endroits : les flocons de la partie moyenne des vases (on a opéré dans des fioles cylindriques, pour se rapprocher des conditions ordinaires et donner plus de profondeur au liquide) sont d'un brun-olivâtre. En examinant au microscope les différents points de ces cultures, on remarque que les coussinets de la surface sont formés de filaments enchevêtrés vers le centre, et se terminant en filaments de plus en plus minces vers la périphérie. La partie qui dépasse le liquide est formée d'un feutrage d'hyphes conidifères de *Penicillium*,

dont les conidies sont en chapelets de deux ou trois seulement, et de diamètre plus fort que celles du *Penicillium glaucum* (6 à 7 μ). Ces colonies se continuent avec celles de la partie moyenne du liquide, qui elles-mêmes présentent le même aspect microscopique que celles du fond. Elles sont en effet formées de filaments bruns analogues à ceux que l'on trouve dans les vieilles solutions d'acétate de potasse.

Cette expérience montre donc que la contamination du plus grand nombre des solutions se ferait directement par chute des conidies dans les liquides débouchés bien plus que par les conidies apportées par l'eau qui a servi à préparer la solution, ou par la surface des filtres qui ont servi à la clarifier.

ACÉTATE DE SODIUM. — Nous avons eu entre les mains une solution de ce sel au cinquième, que nous avons préparée nous-même pour la gélatinisation. Le flacon qui la contenait portait près de son fond, au bout d'environ deux mois, quelques légers flocons grisâtres, qui, examinés au microscope, rappelaient ceux des solutions d'acétate de potasse, mais qui étaient un peu plus grêles et plus noduleux ; cet aspect était dû à ce que plusieurs des cellules étaient renflées en pilon ou en massue au milieu d'un filament formé d'articles cylindriques plus ou moins allongés. L'aspect était à peu près exactement celui des *Hygrocrocis* du chlorure de sodium, que nous décrirons plus loin.

La culture, du reste, nous donnait de l'*Hormodendron* et du *Penicillium*.

IODURE DE POTASSIUM AU DIXIÈME (Pl. XIII, fig. 5, partie gauche). — Les mycéliums rencontrés au sein de ce liquide légèrement jaunâtre par suite d'un commencement de décomposition avaient la forme de boutons hémisphériques ou ovales, fixés à la paroi du flacon à diverses profondeurs. Ces boutons étaient de couleur blanc-brunâtre, et de forme parfaitement régulière. Le diamètre des plus gros atteignait deux centimètres.

Examinés au microscope, ils se montraient constitués par des éléments filamenteux semblables à ceux que L. Marchand a décrits dans son *Hygrocrocis arsenicus*, mais de diamètre plus faible, et de couleur un peu jaunâtre seulement. Au milieu des filaments on rencontrait un grand nombre de spores, les unes

rondes, les autres ovales, de couleur fauve-clair, lisses, d'environ 8μ dans leur plus grand diamètre, d'autres plus grandes, tout à fait hyalines, d'environ 10μ .

On voyait aussi dans les préparations un certain nombre de vésicules colorées, correspondant probablement à celles que Marchand appelle des sporangioles. Quelques-uns se présentaient, ainsi qu'il l'a décrit, sous la forme d'ampoules de 40μ sur 20μ environ; mais d'autres étaient lenticulaires, de 50 à 60μ de diamètre; tous offraient une couleur d'un brun-cannelle. Nous n'avons pas vu ces corps insérés sur le thalle: ils étaient tous libres, la plupart isolés, quelquefois groupés en amas de sept à huit. Tous ces sporangioles, à paroi peu nettement aréolée, étaient vides de tout contenu, qui semblait être sorti par une ouverture de leur surface. Peut-être avaient-ils renfermé les spores hyalines grosses de 10μ que l'on trouvait libres çà et là au sein du liquide.

En soumettant à la culture sur pomme de terre les mycéliums trouvés dans cette solution, nous avons pu y caractériser nettement et en séparer sur les stries plusieurs organismes:

1° Le *Penicillium glaucum*, qui s'y est montré peu abondant;

2° Un *Aspergillus* à conidies lisses, rondes, de 2μ 3 à 2μ 5 de diamètre, dont les basides recouvraient seulement les deux tiers supérieurs du conidiophore.

Les dimensions de ces conidies sont celles que donne Duclaux (1) aux spores du Champignon qu'il a cultivé sous le nom d'*Aspergillus glaucus*; ce sont aussi celles que donne Gayon (2) aux spores d'une espèce qu'il a trouvé dans des œufs moisissés;

3° Un *Aspergillus* à conidies ovoïdes, échinulées, de dimensions $7,4 \approx 4,2$, ou $8 \approx 6$. Ce sont à peu près les dimensions de celles de l'*Asp. repens* Corda;

4° Un *Sterigmatocystis* à conidiophore recouvert sur toute sa surface de basides en massue, portant chacune deux à cinq (le plus souvent trois) stérigmates à peu près cylindriques; conidies

(1) Duclaux. *Encycl. chim.* T. IX.

(2) Gayon. *Recherches sur les altérations des œufs*. Thèse Fac. Sc. Paris, 1875, chap. II.

jaune d'ocre, de $3\mu 5$ environ de diamètre, lisses. L'optimum de germination de ce *Sterigmatocystis* (1) paraît être aux environs de 28° , ainsi qu'il résulte de nos cultures faites à $15-20^\circ$, à 28° , et à $37-38^\circ$.

ACIDE PICRIQUE (Pl. XIII, fig. 5, partie droite). — Une solution de ce corps, provenant d'un laboratoire de l'Ecole de pharmacie de Paris, présentait un dépôt faiblement granuleux, peu cohérent. Chacun de ces granules se montrait formé de quelques hyphes semblables à celles trouvées dans le bromure de potassium; celles-ci émettaient des filaments fins, semblables à ceux des thalles ordinaires de *Penicillium*, et formant la plus grande partie du grain cotonneux ainsi constitué.

On voyait aussi dans la préparation quelques conidiophores d'un *Aspergillus* à conidies de 2μ et dont les basides recouvraient seulement la moitié ou les deux tiers supérieurs du conidiophore.

Ces filaments, soumis à la culture, n'ont donné lieu à aucune végétation.

FERROCYANURE DE POTASSIUM A $\frac{1}{10}$ (Pl. XIII, fig. 6, partie droite). — On observe dans cette solution de très-légers flocons brunâtres, qui, examinés au microscope, se montrent formés de filaments râpeux, constitués par des files de grosses cellules en forme de tonnelets, ressemblant aux cellules courtes des filaments du bromure de potassium, et de couleur faiblement ardoisée.

Ces filaments, transportés sur pomme de terre, y donnent avec du *Penicillium* le même *Hormodendron* que les végétations étudiées jusqu'ici, mais celui-ci est vert-olive clair.

CHLORURE DE SODIUM (Pl. XIII, fig. 6, partie gauche). — Au sein des solutions de ce sel, à diverses concentrations, on rencontre, si la solution est récente, des flocons blanchâtres, soit fixés au fond du flacon, soit flottants au sein du liquide.

Dans les solutions déjà anciennes (plusieurs mois de date) ces touffes ont acquis l'aspect de filaments brunâtres, grossièrement enchevêtrés, et formés de cellules à parois brunes, les

(1) Nous décrirons ultérieurement le champignon que nous ne faisons que mentionner ici.

unes allongées et cylindriques, les autres piriformes ou sphériques, à contenu noir très-foncé ; somme toute, ressemblant beaucoup à celles des solutions de bromure de potassium.

Soumises à la culture, ces productions donnent également l'*Homodendron*, puis le *Penicillium glaucum*.

CHLORURE DE BARYUM (Pl. XIII, fig. 4). Nous avons eu l'occasion d'examiner une seule solution de ce sel. C'était un liquide acide servant à la recherche du plâtre des vins (chlorure de baryum, 4 grammes 781 ; acide chlorhydrique, 4 grammes ; eau distillée, 1.060 c. cubes). Les filaments mycéliens que nous y avons rencontrés y flottaient sous la forme de traînées nuageuses d'un blanc-jaunâtre, faciles à dissocier.

Après lavage et examen dans la solution iodée, nous avons trouvé la masse formée de filaments cylindriques à cloisons espacées (cellules de 5 à $6 \approx 1$), qui, terminés en pointe fine, présentaient dans leurs parties les plus larges des renflements cylindriques, ovoïdes, ou sphériques, quelquefois ampullaires ou en forme de matras. Ces renflements avaient un diamètre souvent trois ou quatre fois plus grand que les cellules voisines, et une paroi hyaline d'épaisseur presque double. L'ensemble du thalle était parsemé de grosses gouttes très réfringentes, formant deux à trois bulles allongées dans les cellules cylindriques, et deux à cinq globules sphériques dans les renflements. Ces gouttes réfringentes se coloraient avec intensité par l'orcanette acétique. La chaleur les faisait se fusionner. C'étaient donc des globules gras.

L'eau iodée teignait en jaune les parties cylindriques et l'extrémité amincie des filaments. La membrane des cellules renflées bleissait nettement sous l'influence de ce réactif, et avec d'autant plus d'intensité que le diamètre de la cellule était plus considérable.

Il y avait donc dans cette membrane une certaine quantité de cette variété particulière d'amidon qui a été signalée dans la membrane de quelques Champignons (1).

(1) Voir à ce sujet : Bourquelot. (*Bull. Soc. myc.* t. V, 1891, p. 155, avec la bibliographie). De Seynes (*C. R. Ac. Sc.*, 21 avril 1879). Tapret (*J. Ph. et Ch.*, VI^e série, T. V, 1^{er} janv. 1897).

Sur pomme de terre, ces filaments donnaient naissance au *Penicillium glaucum*.

ANESTHÉSIQUE DE SCHLEICH. — J'ai eu l'occasion d'observer les filaments mycéliens d'un des liquides employés sous ce nom dans l'art dentaire. Ce liquide était ainsi composé : chlorhydrate de cocaïne, 0 gr. 10; chlorhydrate de morphine, 0 gr. 025; chlorure de sodium, 0 gr. 20; acide phénique à 5 %, deux gouttes; eau distillée, 100 grammes.

A l'examen microscopique, les flocons qui s'y étaient développés se montraient formés de tubes en lacis serrés, semblables à ceux observés dans les autres solutions alcaloïdiques, que nous décrivons plus loin. Mais ici, on voyait en outre un certain nombre de spores rondes, lisses, grisâtres, de $4\mu 5$ à 6μ de diamètre, ainsi qu'une certaine quantité d'autres spores de dimensions cinq ou six fois plus grandes, à contenu granuleux ou oléagineux. Celles-ci étaient les spores d'une Mucorinée, le *Rhizopus nigricans*, ainsi que l'ont montré les cultures; les filaments et les autres spores appartenaient au *Penicillium glaucum*, de la variété à conidies grises. Sur les stries, on a pu voir croître ce dernier organisme, avec les conidies glauques telles qu'il les donne habituellement.

SULFATE DE SPARTÉINE (solution à $\frac{1}{50}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{20}$). (Pl. XIII, fig. 8, partie droite). — Dans toutes les solutions examinées, les mycéliums ont toujours l'aspect de filaments flottants, comme ceux de la solution de chlorure de baryum; mais ils ne présentent que de rares dilatations ampullaires, qui bleuissent faiblement par l'eau iodée. On y trouve aussi quelques gouttes huileuses, mais plus petites et beaucoup plus rares que celles de l'organisme du chlorure de baryum.

SULFATE DE QUININE (à $\frac{1}{20}$, à $\frac{1}{100}$) (Pl. XIII, fig. 8, partie gauche). — L'étude de cette solution médicamenteuse offrait un intérêt particulier, car plusieurs observateurs, tels que J. Sachs, P. de Candolle, E. Heim (1), y avaient déjà signalé des végétations cryptogamiques. Ce dernier observateur y avait même trouvé un *Aspergillus* à spores glauques.

(1) Heim (Bull. Soc. myc. Fr. T. IX, 1893, p. 239).

Nous n'avons rencontré dans nos solutions de sulfate de quinine d'autres mycéliums que des filaments très fins, cloisonnés, qui, soumis à la culture, nous ont donné uniquement du *Penicillium*.

ÉMÉTIQUE ($\frac{1}{20}$, $\frac{1}{50}$, $\frac{1}{100}$). — Toutes ces solutions renferment des filaments entièrement semblables à ceux du sulfate de spar-téine, et formés par le même organisme.

Nous avons également rencontré dans deux échantillons une levûre paraissant être la même que celle que nous avons mentionné à propos de la liqueur de Fowler.

Nous avons remarqué que la solution de tartre stibié était peut-être l'une de celles qui se peuplaient le plus facilement de moisissures. Une solution préparée à froid, puis filtrée, présente déjà, au bout de quatre à cinq jours, des flocons très visibles ; au bout d'une dizaine de jours, le fond du flacon est recouvert d'un tomentum abondant.

Cette facilité à se laisser envahir par les moisissures semble, du reste, partagée par toutes les solutions renfermant de l'acide tartrique ou des tartrates. (Observations de Barnouvin sur les solutés de tartrate borico-potassique.)

ACIDE BORIQUE A 3 %. — Toutes les solutions un peu anciennes que nous avons pu examiner étaient troublées près de leur fond par les mêmes flocons hyalins rencontrés d'autre part dans l'émétique. Nous n'avons fait de cultures qu'avec une seule solution, provenant d'une salle d'hôpital, où elle était conservée dans un bocal à large ouverture, recouvert seulement d'une tarlatane gommée.

Cette solution,ensemencée sur divers milieux (pomme de terre neutre et acide, bouillon de viande), s'est montrée riche en microorganismes divers, en même temps qu'en *Penicillium* (ce dernier se montrant surtout sur les milieux acides). Le fait de rencontrer des bactéries dans ce prétendu antiseptique n'est pas nouveau, mais il nous a paru intéressant de le signaler une fois de plus.

Nous reviendrons, du reste, sur l'emploi de l'acide borique, à propos de l'action des antiseptiques sur le *Penicillium*.

SULFATE DE SOUDE. — Nous avons trouvé dans une solution

purgative de ce sel (à environ 50 grammes par litre), outre le *Penicillium*, une Mucorinée que nous n'avons pu déterminer avec certitude. C'est un *Mucor* qui ressemble au *M. mucedo*, mais qui en diffère par le peu de hauteur de ses pieds sporangifères (un centimètre au plus). C'est la seule fois que nous ayons observé cette Mucorinée. Il est probable que la rareté des Mucorinées dans les solutions tient à ce que leurs spores, plus sensibles que celles du *Penicillium*, y sont rapidement tuées par endosmose.

SULFATE DE ZINC A $\frac{1}{100}$. — Mêmes filaments que ceux du sulfate de spartéine et de même nature.

ACIDE TARTRIQUE ($\frac{1}{5}$, $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{100}$...). — On y trouve constamment des filaments très fins, enchevêtrés, de *Penicillium*.

ACIDE TARTRIQUE ET CARBONATE DE MAGNÉSIE (Pl. XIII, fig. 7). — Cette solution, qui servait à préparer le liquide de Raulin, présentait après quelques semaines des touffes floconneuses blanches, les unes au fond du liquide, les autres flottant à la surface. Celles-ci, d'un blanc éclatant sur leur surface libre, y présentaient des hyphes conidifères de *Penicillium glaucum*, mais à conidies incolores, et plus grosses (5 à 6 μ) que celles du *Penicillium* normal. Elles étaient du reste parfaitement capables de germer sur les milieux ordinaires. L'hyphe conidifère, au lieu d'avoir des rameaux à diverses hauteurs, ne portait le plus souvent qu'un bouquet de cinq ou six basides, figurant ainsi une sorte d'ombelle. Nous signalons ici en passant ce fait que nous retrouverons plus loin, en étudiant les variations du *Penicillium glaucum* sous l'influence du milieu.

De toutes les observations que nous venons d'exposer, il résulte que nous n'avons rencontré, au sein des liquides les plus divers, qu'un petit nombre d'organismes mycéliens. Deux fois seulement nous avons rencontré des Mucorinées; deux ou trois fois des Levûres; deux fois des genres voisins du *Penicillium* (*Aspergillus* et *Sterigmatocystis*). Ces faits sont d'autant plus remarquables que, d'une part, nous avons expérimenté sur des liquides de provenances très-diverses, et que, de l'autre, plusieurs de nos solutions étaient très-manifestement exposées à d'autres agents de contamination. C'est ainsi que l'examen de

bouchons de liège de plusieurs de nos solutions nous a permis d'y trouver l'*Aspergillus repens* en pleine fructification, quelquefois même avec des périthèces. De vieux extraits et électuaires, placés à proximité de ces flacons, renfermaient le même *Aspergillus* très-abondant et très-bien fructifié.

Le *Penicillium glaucum* associé ou non à un *Hormodendron* semble donc se développer dans les solutions à l'exclusion presque complète des moisissures voisines.

L'étude microscopique des filaments formés par ce Champignon nous permet de les ranger en deux groupes, suivant la neutralité ou l'acidité du milieu :

1° *Solutés alcalins ou neutres*.— Filaments à articles courts, et à parois épaisses ; membrane et souvent contenu cellulaire colorés. Thalles en flocons denses.

2° *Solutés acides et alcaloïdiques*. — Filaments formés d'articles cylindriques, allongés, à parois minces ; membrane et contenu cellulaire incolores. Nombreuses gouttes d'huile dans les grosses cellules. Thalles en flocons peu consistants.

III. — Variations dans le développement du *Penicillium glaucum* et de l'*Hormodendron* des solutions.

Plusieurs botanistes ont décrit et figuré le *Penicillium* que Link a nommé *Penicillium glaucum*, et qui est le même que Fries avait décrit sous le nom de *P. crustaceum*(1). La monographie de Brefeld (2) (1874) renferme l'historique des travaux faits sur la morphologie de ce Champignon jusqu'à cette date.

Les auteurs qui en ont traité le considèrent aujourd'hui comme une espèce bien définie et dont les caractères distinctifs les plus nets sont la ramification du conidiophore et les dimensions ainsi que la couleur des conidies. D'après la diagnose admise aujourd'hui, et reproduite par Saccardo, les conidiophores sont « *apice ramoso-penicillatis, ramis solitariis vel* »
« *geminatis, erectis, apice 1-2 furcatis, ramulis erectis ;* »
« *conidiis..... concatenatis, sphaericis vel late ellipticis, brevibus, æruginoso-hyalinis, 4 μ diam. »*

Tel est le *Penicillium glaucum* typique, celui que l'on obtient sur le pain humide ou sur les tranches de fruits exposés à l'air. C'est aussi la forme sous laquelle ont fructifié nos *Hygrocrocis*.

A la suite de cette espèce, Saccardo (3) décrit, dans sa section des *Glaucoscenti et Virentes*, un certain nombre d'espèces très-voisines. Entre autres, le *Penicillium digitatum* Fries (*Monilia digitata* Persoon), qui diffère du précédent par les caractères suivants : « *Ramis solitaris accumbentibus, erectis, ramulosis,* »
« *ramulis binatis vel verticillatis, conidiis sphaericis vel* »
« *ellipsoideis, levibus, albis, demum glaucis, 4-6 μ diam. »*

L'habitat de celui-ci est plus spécialement, d'après son auteur, le citron moisi.

(1) Fries. *Systema mycologicum*, Gryphiswald, 1829, t. III, p. 406.

(2) Brefeld. *Schimmelpilze*, II, Leipzig, 1874.

(3) P. A. Saccardo, *Sylloge fungorum*, vol. IV, Aprilis 1886.

Une troisième espèce qui semble s'écarter davantage du *P. glaucum* est le *P. griseum* Bonorden. Celle-ci se distingue à première vue par la coloration de ses conidies, qui sont grises « *Conidiis sphaericis griseis vel subvirescentibus quam P. glauci « duplo crassioribus* ».

Au cours de nos recherches sur les mycéliums flottants, nous avons eu l'occasion, en ensemençant les flocons d'un hydrolat de tilleul, d'en obtenir sur pomme de terre un *Penicillium* qui recouvrait le support d'un enduit d'un gris terreux. Sauf la dimension des conidies ($2\mu 1$ à $3\mu 5$), ils offraient les caractères du *P. griseum* (1). Par une transplantation sur milieux acides, il donnait le *P. glaucum*.

Dans le but de rechercher les rapports du *P. digitatum* avec celui-ci, je me suis procuré des fruits de citron moisis. Ils étaient entièrement couverts d'un *Penicillium* plus trapu que le *P. glaucum*, et répondant bien aux caractères du *P. digitatum*. Ses conidies ovoïdes, lisses, avaient $5\mu 3$ à $6\mu 3 \approx 4\mu 2$. Chacune d'elles renfermait deux ou trois grosses gouttes huileuses.

Ayant ensémené ces conidies sur liquide de Raulin, elles m'ont donné des thalles semblables à ceux du *P. glaucum*, mais d'un vert plus franc et portant des conidies presque rondes, de $3\mu 4 \approx 3\mu 1$ en moyenne, par conséquent identiques à celles du *P. glaucum*.

Avant examiné un *Penicillium* qui s'était développé sur un bouchon de liège enduit de corps gras, je lui ai trouvé des conidies ovoïdes, de $4\mu 2 \approx 3\mu 1$. Celui-ci, cultivé sur Raulin, me donnait également des conidies rondes de *P. glaucum*.

Alors même que ces observations ne prouveraient pas irréfutablement la non-existence des *P. digitatum* et *griseum* en tant qu'espèces distinctes, elles montrent du moins que le *Penicillium glaucum* est susceptible de variations assez considérables dans la structure et la coloration de son appareil coni-

(1) Mon collègue et ami L. Lutz m'a dit avoir observé que souvent, lorsqu'on cultivait le *Penicillium glaucum* sur des milieux nutritifs renfermant des composés azotés difficilement assimilables, on obtenait des formes grises tout à fait semblables à celles fournies par l'hydrolat de tilleul.

dien et de ses conidies (1), bien que l'on considère généralement celle-ci comme peu sujette à variation dans une même espèce.

Etudions maintenant de plus près les différentes formes bien définies que l'on obtient en partant d'un mycélium hygroscopique, et voyons comment ces formes se relient entre elles.

Nous avons vu que lorsqu'on examinait un fragment des flocons noirâtres qui flottent à la surface des solutions de bromure de potassium ou d'acétate de potasse, on observait que certaines branches émergées se désarticulaient à leur sommet en cellules ovoïdes dont quelques-unes se trouvaient cloisonnées transversalement.

En ensemençant ces cellules ovoïdes sur milieux neutres tels que la pomme de terre, on obtient le développement, à partir du second ou du troisième jour, de colonies apparaissant d'abord le long des stries comme un duvet blanchâtre, mais ne tardant pas à brunir et à donner vers le quatrième jour une bande veloutée d'un gris-brun. Si nous abandonnons la culture à elle-même dans la position verticale, nous voyons bientôt se former dans le liquide du fond du tube une série de petits îlots floconneux, d'abord blancs, puis semblables à la culture sur milieu solide, et qui proviennent de la chute des conidies de la pomme de terre dans le liquide.

Les coussinets qui forment la culture en milieu solide sont formés d'un mycélium rampant, constitué par des cellules cylindriques à parois brunes, d'un diamètre d'environ 4μ , et de longueur variant de $4 \approx 1$ à $6 \approx 1$ par rapport au diamètre. Quelques-unes sont un peu renflées en tonnelet, et ont $3 \approx 1$ seulement. Ce mycélium est fixé au support par quelques-uns de ses articles qui se différencient en crampons. Certaines branches sont dressées, cylindriques à leur base, et se rétrécissant à leur sommet, au voisinage des premières ramifications qu'elles émettent.

De ces hyphes dressées se détachent à angle aigu des ra-

(1) Tulasne semble avoir admis encore des variations plus considérables. Il écrit : (Selecta Fung. Carpol. T. 1, p. 227), *Huc adde in Penicillii quandoque formam videri diminutam Aspergilli glauci Linck.* »

meaux d'aspect moniliforme, ce qui est dû à ce que toutes les cellules qui les constituent sont étranglées à leurs deux extrémités. Ces éléments sont de dimension variable, d'autant plus petits qu'il sont plus rapprochés du sommet des rameaux. Les cellules de la partie moyenne ont la forme bi-ogivale, à paroi lisse, épaisse et brune, comme le reste du thalle. Elles sont divisées en deux par une cloison transversale plus mince que la paroi de la cellule. Cette cloison est le plus souvent médiane, quelquefois plus rapprochée de l'une des extrémités.

L'ensemble a la forme d'un petit arbre à branches très-ramifiées, formées de chaînettes à éléments ogivaux (Pl. XIV, fig. 11 et 12).

Celles de ces cellules qui se sont désarticulées dans la préparation portent à chacun de leurs sommets une petite pointe, quelquefois deux ou trois, suivant qu'elles donnaient insertion à deux ou trois rameaux. Les cellules placées ainsi aux ramifications sont plus grandes que les autres, elles peuvent avoir 15 à 21 μ de long. Les dimensions des cellules ovoïdes sont assez variables ($8\mu 5 \approx 5\mu 2$; $6\mu 3 \approx 10\mu$). Outre ces cellules en ogive, on trouve au sommet des rameaux des éléments jeunes de forme différente, soit sphériques, soit orbiculaires-allongés. Les conidies sphériques ont 5 $\mu 5$, 5 $\mu 8$, 6 μ . Les conidies ovales ont ordinairement à peu près les mêmes dimensions (1).

Ces conidies apparaissent sous la forme d'une petite proéminence qui bientôt s'arrondit en sphère, et se sépare de la cellule-mère par un petit pied très-net. Elle se renfle jusqu'à acquérir un diamètre égal à peu près à celui des filaments du thalle ; puis elle s'accroît seulement suivant un axe vertical, et enfin, lorsque sa longueur est devenue à peu près triple de son diamètre, elle prend une cloison transversale, et dès lors est arrivée au terme de sa croissance.

(1) Bonorden (*Bot. Zeitung*, 1853, p. 286) décrit et figure un *Hormod. atrum* sans cloison dans les conidies. D'autre part, il figure, sous le nom de *Scolichotrichum tomentosum*, un organisme qui ressemble aux stades jeunes de notre *Hormodendron* : il le rapproche avec doute du *Cladosporium atrum* Fresenius. Comme pour les autres espèces, il ne donne pas les dimensions des organes, ce qui rend les espèces très-difficiles à identifier.

Il n'est pas nécessaire que les conidies soient arrivées à cet état final pour pouvoir reproduire la plante. En réalité, toutes les conidies, dès qu'elles ont atteint le diamètre du rameau qui les porte, ont la faculté de germer. Seulement les plus petites germent avec un léger retard sur les autres (pl. XV, fig. 27 à 29). Bien plus, des cellules cylindriques de thalle, encore adhérentes les unes aux autres, peuvent avoir la faculté germinative.

La description que nous venons de donner se rapporte à un *Hormodendron* que nous avons obtenu d'une solution vieille d'acétate de potassium, ensemencée sur pomme de terre.

En comparant cette plante avec celles décrites et figurées par les auteurs, nous voyons qu'elle est tout-à-fait semblable à l'espèce décrite et figurée sous le nom d'*Hormodendron olivaceum* (1), sans pour cela prétendre que ce soit la même plante. En effet, nous savons que des formes conidiennes identiques peuvent appartenir à des espèces différentes (2).

Les *Hormodendron* obtenus du bromure de potassium dans les mêmes conditions diffèrent très-peu de ceux-ci. Les cellules pédiculées, au lieu d'être assez régulièrement ogivales, sont le plus souvent en forme d'œuf ou de massue courte. Nous en dirons autant des formes provenant de la culture des mycéliums d'autres solutions (ferrocyanure de potassium, liqueur de Fowler, etc.)

C'est ainsi qu'une solution de bromure de potassium à $\frac{1}{5}$, préparée par nous et filtrée avec soin, nous a donné, au bout de six semaines environ, un développement du mycélium assez abondant.

Au fond du flacon sont apparues trois petites touffes hémisphériques, d'un vert-bouteille ; la plus grosse d'entre elles avait le diamètre d'une petite lentille : environ trois mois après, elles étaient nettement brunâtres, et ressemblaient à celles des solutions vieilles de même nature.

(1) Corda, *Icones. Fung.* ; T. III, pl. 12, fig. 35, donne une figure de son *P. olivaceum* qui ressemble exactement à notre *Hormodendron*.

(2) Costantin, *Remarques sur la convergence des formes conidiennes* (*Rev. gén. de Bot.*, 1893, t. V, p. 84). Voir aussi A. N. Berlèse, *Cladosporium et Dematium* (*Bull. Soc. Mycol., Fr.*, 1895, p. 34), avec indications bibliographiques antérieures.

Nous avons prélevé des fragments de ces végétations à différentes époques. La touffe jeune était formée de filaments semblables aux hyphes rampantes des autres *Hormodendron*, mais de couleur verdâtre. A leur sommet, les rameaux dressés portaient une ou deux conidies bicellulaires, ogivales. La couleur et la rareté des ramifications permettaient donc seules de les distinguer des formes plus anciennes.

A une période plus avancée de leur existence, les hyphes rampantes, de cylindriques qu'elles étaient, sont un peu étranglées au niveau de leurs cloisons; quelques-uns sont même presque sphériques. Quelques rameaux dressés portent deux ou trois conidies bicellulaires, et un certain nombre d'autres, détachées pendant la dissociation de la touffe, sont éparses dans le liquide de la préparation (1).

Le fait d'avoir rencontré des formes de couleur variable nous a fait penser qu'il n'y avait là qu'une question d'accoutumance plus ou moins grande aux milieux de culture.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait des ensemencements d'un même *Hormodendron* sur divers milieux, acides, alcalins ou neutres, solides et liquides. Nous avons opéré de la manière suivante :

Un *Hormodendron*, provenant d'une vieille solution de bromure de potassium ensemencée sur pomme de terre, a été transplanté sur la solution gélatinée de bromure de potassium à $\frac{1}{5}$, où il s'est conservé avec ses caractères pendant un temps très-long (plus de quatre mois).

Au moment où il était en pleine végétation, nous l'avons ensemencé, sur du liquide de Raulin ordinaire, neutre et alcalin à divers degrés.

1° *Liquide de Raulin ordinaire*. — Après trente-six heures environ, il y a déjà des traces de végétation, qui deviennent très-évidentes à la fin du second jour. Au quatrième jour, on remarque que la surface de la culture, qui avait l'aspect d'une fine poussière blanchâtre, commence à se teinter de gris un peu verdâtre d'abord, mais qui les jours suivants tire de plus en

(1) A ce stade, il rappelle l'*Amphitrichum olivaceum* Corda (T. I, pl. IV, fig. 24).

plus sur le gris-brun. Examinées au moment où elles sont encore blanches, les cultures se montrent formées de filaments à grosses cellules cylindriques de $2 \approx 1$, formant à la surface du liquide des rosettes dont le centre est occupé par une conidie d'ensemencement. A partir du moment où la teinte foncée apparaît, on voit que la plupart des cellules, d'abord cylindriques, se sont légèrement rétrécies à leurs extrémités, et que certaines d'entre elles (toutes les quatre ou cinq) se sont divisées par une cloison oblique, ce qui change l'aspect des jeunes thalles prélevés à ce moment. Quelques-unes des cellules ainsi cloisonnées montrent un contenu formé d'un sphéroïde gris-cannelle ou noirâtre qui la remplit incomplètement, comme une graine dans un achainé. La masse ainsi formée est au début toujours adhérente à la membrane cellulaire par une partie de son étendue.

Plus tard encore (10^e jour), le contenu des matras, qui s'est accru de plus en plus, se sépare en un certain nombre de touffes hémisphériques brunâtres, reliées seulement les unes aux autres par un fin lacis hyalin qui règne sur le bord des touffes, et qui, par suite de la culture, *diminue de plus en plus*, au fur et à mesure que chaque grain brun s'accroît. Il n'y a bientôt plus dans les matras, au bout d'un mois, qu'une quantité de grains bruns, hémisphériques ou tout-à-fait arrondis, les uns posés sur le liquide, les autres appliqués le long des parois ou tombés au fond, ces derniers entourés d'une auréole hyaline formée d'un faible tomentum très-ténu. Puis les choses restent en l'état pendant plusieurs mois (nos observations ont été faites sur des cultures de cinq mois et demi à six mois, dont l'aspect n'avait pas varié depuis le troisième mois). Chacun de ces grains, écrasé sous le microscope, était formé d'une masse de filaments à grosses cellules courtes et brunes, dont la plupart contenaient des corps bruns semblables à ceux que nous avons déjà signalés plus haut. Cette intrication de filaments constituait un sclérote très-friable, d'une grosseur variant de celle d'une pointe d'aiguille à celle d'un petit grain de poivre. Quelques-uns de ces sclérotés étaient soudés ensemble, et affectaient alors la forme d'une masse lobée atteignant parfois le volume d'une lentille. (Pl. XVI, fig. 30.)

Pour étudier la constitution de ces sclérotés, nous en avons

inclus un certain nombre dans la paraffine, et les avons débités en séries de coupes minces, de $\frac{1}{50}$ et $\frac{1}{120}$ de millimètre. Ces dernières permettaient de bien voir la constitution du tissu et l'arrangement des cellules; ce sont elles qui nous ont permis de décrire la structure du sclérote. (Pl. XVI, fig. 31.)

Nous remarquons tout d'abord, sur la coupe verticale des sclérotés convexes ayant flotté sur le liquide, que ces corps affectent la forme de calottes creuses, posées par leurs bords sur le liquide, et y formant une voûte émergée. A l'intérieur de cette voûte et sur les bords, pendent de nombreux filaments bruns à cellules courtes, semblables à celles des filaments d'*Hygroscopicus arsenicus*.

La paroi du sclérote est constituée par un pseudo-parenchyme formé des mêmes cellules courtes que l'écrasement nous y avait fait découvrir. Au milieu de ce pseudo-parenchyme sont répandues en tous les points des cellules sphéroïdales de diamètre variable, à contenu brun-cannelle. Les plus petites de ces cellules ont un volume presque double de celui des cellules du pseudo-parenchyme; les plus grosses ont 12, 17, rarement 20 μ de diamètre. Sur ces dernières la paroi porte quelquefois des épaississements internes, qui en rendent le contenu bosselé (*a*). Cette paroi est très-épaisse, et le contenu, séparé de cette paroi par un espace clair, est formé par une masse d'un brun-roux, de forme plus ou moins arrondie, quelquefois vaguement divisée en deux ou trois lobes par des sillons peu marqués (Dans quelques cas très rares, on trouve deux ou trois de ces masses réunies dans la même enveloppe. Dans les grosses cellules, le contenu est souvent placé au centre; dans les petites, il est la plupart du temps accolé à la paroi). Sur la coupe transversale, ces masses apparaissent nettement formées de couches concentriques.

Quelle est la signification de ces grosses cellules d'aspect et de contenu si particuliers? Pour nous en rendre compte, nous nous sommes proposé d'étudier leur formation et leur développement.

Pour cela, nous avons écrasé un gros sclérote, aussi aseptiquement que possible, avec une baguette de verre, et nous en avons fait des ensemencements avec un fil de platine sur des

milieux solides et liquides, dans des chambres humides et dans des matras. Les cultures en chambre humide sur Raulin gélatinisé nous ont permis d'en suivre à la fois la germination et la production. Aussi décrivons-nous ici l'évolution de ces cultures.

Au bout de trente heures environ, on voit chacune des cellules brunes se gonfler, et émettre en un ou plusieurs points de sa paroi des tubes germinatifs, qui ne tardent pas à se cloisonner et à se ramifier. Cette première phase ressemble tout-à-fait à la germination des conidies de la forme *Hormodendron*. Les thalles ainsi formés s'accroissent avec une grande rapidité, pendant que la cellule dont ils émanent pâlit de plus en plus, puis ne peut plus être distinguée par son contenu des autres cellules du thalle. La croissance continue ainsi pendant deux jours et demi environ.

Vers la fin du troisième jour, le jeune thalle ainsi formé cloisonne la plupart de ses articles, dont plusieurs se renflent légèrement. Il est alors formé de cellules courtes et trapues, dont la plupart sont renflées en tonnelet. A ce moment, surtout dans les éléments les plus renflés du thalle, le protoplasme commence à s'assombrir. On y distingue maintenant trois ou quatre grains réfringents, entourés d'une aréole commune de protoplasme grisâtre. A ce moment, les choses peuvent se passer de deux façons.

a. — Le protoplasme coloré peut se réunir à l'un des pôles de la cellule, et s'y condenser de plus en plus, en même temps que son contour devient plus net. Finalement, on a l'une des masses brunes précédemment décrites, accolée à la paroi cellulaire.

b. — Si la cellule où le phénomène a lieu est un peu allongée, le protoplasme se condense en bande large dans sa région équatoriale ; puis l'un des bords de cette bande s'affirme de plus en plus nettement, et donne naissance à une cloison un peu oblique dont le protoplasme occupe l'une des faces. Finalement dans la nouvelle cellule granuleuse ainsi formée, les choses se passent comme dans le premier cas.

Nous avons donc assisté à la formation d'une cellule à contenu fauve, qui grossira et s'arrondira pour donner une cellule semblable à celles dont nous sommes parti.

Etant donné que ces cellules ont un contenu résultant manifestement de la condensation du protoplasma primitif, qu'elles ont une paroi épaisse, et qu'elles se forment lorsque l'*Hormodendron* végète dans des milieux liquides et acides, elles nous paraissent devoir être considérées comme des chlamydospores ou des *Kystes*, constituant une forme de résistance aux conditions extérieures (1).

Les masses noires que constituent certaines cellules des filaments d'*Hygroscopicus* poussant en milieux liquides neutres ou alcalins (liqueur de Fowler, etc.) ne sont pas autre chose que des chlamydospores analogues.

Sur le thalle filamenteux formé par le cloisonnement des hyphes nées de ces chlamydospores, on ne tarde pas à voir apparaître des *Hormodendron* semblables à ceux dont on était parti.

2° *Liquide de Raulin neutre*.— Les choses se passent d'abord de la même manière que sur Raulin acide. Il se produit également des rosettes qui donnent naissance aux chlamydospores ; mais bientôt, au lieu de donner de rares filaments hyalins comme sur le Raulin ordinaire, les rameaux latéraux de ces filaments s'étirent en cellules plus longues et hyalines, comme celles du *Penicillium* ordinaire. En même temps, quelques-uns des filaments les plus gros se dressent dans l'air, et produisent des conidies de la forme *Hormodendron* ; finalement la surface du liquide, au bout d'une dizaine de jours, est recouverte d'une croûte veloutée brunâtre.

3° *Sur liquide de Raulin alcalinisé* (liquide neutre auquel on a ajouté du carbonate de potasse en quantité 1, 2, 3, 4..... 10

(1) Petrowsky a décrit des chlamydospores de *Penicillium glaucum* (*Die Chlamydosporen bei PENICILLIUM GLAUCUM* (Protocoll. des Sitz des Gesellschaft zur Erforsch. des Gouv. Jaros. in natural. Hinsicht, 1875).

Nous n'avons pu nous procurer de ce travail, qu'un court résumé allemand, par *Batalin* (Botanischer Jahresbericht, 1875, p. 226). Ces chlamydospores y sont décrites comme de couleur cannelle (*Zimmsfarben*), épaissies dans des cellules polygonales (l'auteur ne parle pas de sclérotés ni d'une formation analogue). Ces chlamydospores, sur une couche de suc de fruit, donnèrent deux tubes germinatifs, et bientôt des hyphes et des conidies de *Penicillium glaucum*.

fois plus grande que dans le Raulin ordinaire (on remarque que le développement donne encore des formes chlamydospores au début ; mais ici les chlamydospores semblent moins abondantes, et il ne se fait pas de filaments hyalins. Bientôt des *Hormodendron* se produisent en grande quantité, comme sur le Raulin neutre ; ici, l'individualisation des *Hormodendron* est seulement plus rapide.

De ces expériences il ressort donc que la forme *Hormodendron* se produit avec une abondance d'autant plus grande que l'on opère sur un liquide peu acide, neutre, ou alcalin. Toutefois, dans le liquide 10 fois plus alcalin, les conidies hormodendriques ne germent plus : nous avons déjà observé ce fait dans les cultures en liqueur de Fowler.

FORMES ANORMALES DE VÉGÉTATION (1).— Si, au lieu de nous adresser à des formes *Hormodendron* bien nettes (obtenues par passage sur pomme de terre des filaments de l'acétate ou du bromure de potassium), nous essayons de cultiver sur Raulin gélatiné un petit fragment des mycéliums noirs de l'acétate de potassium, nous verrons, si le milieu nutritif est en grand excès, et que nous l'ayonsensemencé dans la profondeur, que les hyphes noires végètent en s'enfonçant dans la gélatine, et en produisant des filaments semblables à elles-mêmes : celles-ci, en cheminant dans le substratum, forment autour d'elles autant de gaines de gélatine liquéfiée. Mais bientôt certaines cellules se flétrissent, semblent se vider de leur contenu ; leurs parois reviennent sur elles-mêmes, tandis que les cellules interposées restent turgescentes. Finalement les cellules flétries semblent disparaître, en laissant dans la gaine liquide une file de cellules ovoïdes brunes, en grains de chapelet, parfaitement isolées les unes des autres (Pl. XIV, fig. 15).

En soumettant à la culture un des plus petits grains noirs

(1) Nous ne considérerons pas ici les formes anormales produites par la submersion tardive des thalles, par exemple la transformation des jeunes chapelets de conidies en filaments végétatifs, qui se produit quand un thalle prêt à fructifier est accidentellement immergé. M. Ray a, du reste, étudié et figuré de tels cas pathologiques pour le *S. alba*. (*Variation des champignons sur l'influence du milieu*, Paris 1897).

qui constituent l'*Hygrocrocis arsenicus* submergé, nous observons, si le milieu nutritif est très-abondant, que les filaments hyalins qui naissent des cellules à contenu noirâtre ne tardent pas à former autour du grain une auréole d'hyphes ramifiées ; seulement, vers le huitième jour, nous avons vu apparaître sur la plupart de ces rameaux de curieuses formations (Pl. XIV, fig. 14 et 16).

Une branche de ces ramuscules, peu de temps après son apparition, se renfle en tête non séparée du reste par une cloison ; la paroi de cette tête paraît avoir un double contour plus marqué que celui du filament. D'autres ont l'aspect de crosses trapues ou de spires à un tour ; dans leur intérieur, on ne voit aucune organisation interne différente du reste des filaments du thalle ; on remarque seulement que le protoplasme y est plus réfringent, et que les colorants nucléaires (hématoxyline, vert de méthyle) s'y fixent d'une façon beaucoup plus intense que dans le reste du thalle.

Examiné à l'aide des plus forts objectifs, et après coloration par l'hématoxyline acide, le contenu paraît formé de fins granules répartis dans une substance fibrillaire intercalaire (Fig. 16).

Ces formations restent stationnaires pendant cinq ou six jours ; au bout de ce temps, on les voit présenter des modifications dans leur forme. Les crosses se déroulent, et bientôt s'allongent en une hyphe d'abord un peu contournée en tire-bouchon (fig. 14, f), mais qui bientôt devient rectiligne comme le reste du filament. Celles qui s'étaient produites à la pointe même d'un rameau donnent une hyphe qui prolonge celui-ci. Celles qui avaient poussé latéralement au niveau d'une bifurcation donnent un rameau qui croît en divergeant à côté de celui qui lui a donné naissance ; celui-ci, du reste, reprend bientôt son développement interrompu, et finalement aucune trace de ces formations ne subsiste plus.

Si nous considérons que ces formations apparaissent lorsqu'on place dans un milieu très-propre à son développement un organisme végétant depuis longtemps dans des conditions misérables (la liqueur de Fowler de laquelle nous avons retiré ces mycéliums avait plus de trois ans de préparation), nous

sommes amenés à les considérer comme des relais dans lesquels la plante condenserait son protoplasme pour lui permettre de s'adapter à ses conditions nouvelles d'existence. Pour ne rien préjuger du rôle et de la nature de ces formations, nous les désignerons sous le nom de *circinules* (*circinula*, petite crosse).

PRODUCTION DES PÉRITHÈCES DU *PENICILLIUM*.— Les périthèces du *Penicillium glaucum* ont été découverts par Lévillé, en 1840. Dans son mémoire « sur les *Sclerotium* », il dit avoir trouvé dans la pulpe de tamarin d'une pharmacie de Paris des corps bruns qui, coupés, donnèrent constamment naissance à du *Penicillium glaucum*, et que par suite il considère comme des sclérotos de cette plante (1).

Dans son mémoire sur le *Penicillium glaucum* paru en 1874, Brefeld (2) décrit en détail la formation et le développement des périthèces (3). C'est après trois semaines environ, dit-il, qu'il a vu apparaître, ça et là *dans la profondeur du substratum*, sur les cordons jusque-là incolores du mycélium, de petites protubérances dont il figure l'aspect. Il les représente comme deux courtes spires enroulées ensemble, auxquelles il donne le nom d'*Ascogone* et de *Pollinode*, et formées par la rencontre de deux branches égales du thalle.

Dans la suite de son mémoire, il décrit les états successifs de ces périthèces, depuis leur cortication aux dépens des filaments accessoires des branches-mères jusqu'au moment où ceux-ci, après avoir produit sur des branches ultérieurement différenciées dans leur intérieur des asques en forme de cellules de levûre, ne renferment plus que des débris de ces asques, mêlés à un grand nombre d'*Ascospores* lenticulaires.

Nous avons essayé d'observer aussi cette formation de périthèces sur le pain; mais, soit que nous ayons opéré sur un pain

(1) Lévillé, « Sur les *Sclerotium* », in Ann. Sc. Nat. 1840.

(2) Brefeld, Schimmelpilze, II, Leipzig. 1874, p. 41 et suiv.

(3) Avec M. Van Tieghem, nous employons exclusivement le mot de *périthèces* pour désigner ces organes, parce qu'ils renferment ou renfermeront des thèques, et que cette appellation les distingue nettement des *sclérotos* tels que ceux décrits plus haut, qui ne sont que des masses de pseudoparenchyme renfermant des chlamydospores.

trop facilement assimilable pour la plante, soit pour toute autre raison, nous n'avons pu obtenir sur ces milieux que du *Penicillium* à formes conidiennes. Nous avons alors songé à nous adresser, comme substratum, à de l'empois d'amidon.

Pour cela, des amidons ont été délayés avec de l'eau distillée, dans la proportion d'une partie en poids pour cinq de liquide. Le mélange, versé en couches d'un centimètre d'épaisseur environ dans des matras d'Erlenmeyer, a été chauffé au bain-marie à 100° pendant un quart d'heure. Le chauffage a été répété le lendemain et le surlendemain, pour bien stériliser l'empois ainsi formé. Après refroidissement, ces matras ont été ensemencés avec un même nombre de gouttes d'une émulsion de conidies de *Penicillium* dans l'eau distillée.

Nos essais ont porté sur quinze amidons différents, ensemencés simultanément ; les cultures étaient abandonnées à la température ordinaire (+12° à 16°). Nous avons observé, dès le début du second jour, des différences très-nettes dans le développement, différences qui n'ont fait que s'accroître pendant les jours suivants. Les observations se sont prolongées pendant un mois ; les amidons sur lesquels se développaient des périthèces ont vu à ce moment leurs cultures rester à peu près stationnaires, sauf l'apparition de plus en plus rare et le développement de nouveaux périthèces.

Devant ces inégalités de développement, nous nous sommes demandé si la variabilité de l'action de l'amylase du *Penicillium* sur les divers amidons n'était pas la principale cause des différences observées. Nous avons alors fait agir sur les empois un liquide contenant à l'état de dissolution les ferments du Champignon.

Dans ce but, une culture de *Penicillium* de seize jours, sur liquide de Raulin renouvelé deux ou trois fois, a été lavée avec soin à sa partie inférieure ; puis on a une dernière fois versé dans la cuvette contenant la culture une couche d'eau distillée d'environ un centimètre ; au bout de vingt-quatre heures, cette eau, décantée et filtrée, a été additionnée de quelques cristaux de thymol.

D'autre part, on avait fait sécher à l'étuve à + 37°, pendant trois jours, une petite quantité de chaque amidon, étalée dans une

cuvette de papier. Ayant pesé avec soin 1 gr. 80 de chacun de ces amidons, on les a délayés dans de gros tubes à essai avec 40 cent. cubes d'eau distillée ; tous ces tubes, mis au bain-marie simultanément, et maintenus à $+ 100^{\circ}$ pendant cinq minutes, ont été, après refroidissement, additionnés chacun de 6 centim. cubes du liquide de *Penicillium* et d'un cristal de thymol. Au bout de six heures environ, après un chauffage au bain-marie pour tuer les enzymes, les contenus ont été complétés à 100 centimètres cubes et mis à déposer. On avait ainsi des liqueurs limpides contenant du sucre interverti et de l'amidon soluble. On a mesuré le nombre de centimètres cubes de chacun de ces liquides qu'il a fallu pour réduire cinq centimètres cubes de liqueur de Fehling étendue de son volume d'eau.

Les chiffres obtenus ont été consignés dans le tableau suivant, où les amidons ont été rangés dans l'ordre décroissant du développement.

On a décrit brièvement, en regard de ces chiffres, l'aspect des cultures au bout d'un mois :

NATURE de L'AMIDON	NOMBRE de centimètres cubes d'eau amidonnée, hydrolysée, nécessaire pour réduire 5 ^{cc} de liqueur de Fehling	ASPECT DES CULTURES
		AU BOUT D'UN MOIS
Seigle	23.5	Vigoureuse culture verte, déjà épaisse et solide après 7 jours.
Féveroles	28 (?) se réduit mal	Vigoureuse culture, mais vert jaunâtre.
Haricots	25	Culture blanc grisâtre, mince, restant telle après un mois.
Lentilles	30	Cultures vigoureuses, d'un vert grisâtre.
Pois	»	Id.
Orge	»	Beau tapis vert continu, moins épais que sur le seigle. <i>Périthèces</i> en formation dans la croûte amylacée des parois du flacon.
Blé	30	Belle culture verte, mais pas de <i>périthèces</i> .
Maïs	23.5	Culture rapide, grisâtre.
Riz	24	Culture verte.
Avoine	28	Id.
Sarrasin	23.5	Culture grisâtre.
Yucca	78	Enduit grisâtre en minces plaques peu cohérentes.
Sagou	54	Petit semis vert, avec quelques pinceaux d'aspect misérable; <i>quelques périthèces</i> .
P. de terre...	20	Semis vert, très clairsemé; <i>nombreux périthèces</i> au début.
Arrow-root .. (du Morauta)	56	Enduit vert-brunâtre en larges plaques; <i>quelques périthèces</i> .
Manioc	»	Culture réduite presque entièrement à <i>quelques périthèces</i> devenant très-abondants après deux mois.
Moussache ...	30	Enduit gris verdâtre mince; <i>très nombreux périthèces</i> .
Tapioca	»	Seulement <i>quelques périthèces rares et petits</i> , souvent dans la profondeur.

Si nous considérons ce tableau, nous voyons que nous pouvons en tirer plusieurs conclusions intéressantes :

1° le développement du *Penicillium* se fait très rapidement sur le seigle et les amidons de Légumineuses, très imparfaitement sur d'autres amidons, tels que ceux de la pomme de terre, de l'arrow-root, et surtout du manioc ; de plus, c'est sur ces derniers amidons que les périthèces se montrent d'une façon constante.

2° Si nous comparons les chiffres qui expriment l'intensité de la réduction de la liqueur de Fehling, nous voyons que la rapidité de croissance n'est pas en relation avec l'intensité de l'action de l'amylase sur les divers amidons. Nous remarquons notamment, que l'amidon de pomme de terre est le plus fortement hydrolysé de tous (du moins dans les conditions de l'expérience), tandis que le *Penicillium* s'y cultive relativement mal (1).

Nous nous sommes demandé si la difficulté de culture sur l'amidon de pomme de terre ne tenait pas à la constitution physique des grains amylicés. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons trituré longtemps dans un mortier de verre de petites portions de cet amidon ; après cette opération qui avait brisé un grand nombre de grains, comme nous l'avons constaté au microscope, les cultures de *Penicillium* ne présentaient aucune différence appréciable avec celles faites comparativement sur le même amidon non broyé.

On ne peut songer à rechercher la cause des différences de développement dans le fait que les amidons défavorables à la culture sont en général privés de ces très-petits grains accessoires qui sont si caractéristiques des amidons de céréales, sur lesquels le développement se fait bien. Il est certain que les amidons de sagou, d'arrow-root, de tapioca, se font remarquer par la régularité relative dans la dimension de leurs grains ; mais l'amidon de pomme de terre présente déjà des éléments de dimension assez inégale, et d'autre part, le riz et le sarrasin, sur lesquels le développement se fait bien, présentent une constance assez grande dans la dimension des grains.

Enfin, on peut penser que les amidons des céréales et des

(1) Ce résultat nous a forcé à revenir sur notre première opinion, d'après laquelle nous accordions à l'inégalité d'action de l'amylase un rôle prépondérant sur les différences de développement observées.

légumineuses sur lesquels le développement se fait bien, sont très-difficiles à purifier, et par cela même renferment toujours des quantités d'azote assez considérables ; mais on remarquera que le riz est tout-à-fait pauvre en azote (7,05 pour cent au lieu de 13 à 20 pour les autres graines amylacées, d'après Payen), et qu'on peut le purifier assez facilement ; cependant, le développement du champignon s'y fait bien.

Il semble donc que nous ne puissions donner d'explication satisfaisante de ces inégalités de développement.

Quoiqu'il en soit, nous avons constaté au bout de quinze jours à trois semaines l'apparition, sur divers empois, de formations particulières que leur développement et leur structure histologique finale nous ont montré être des périthèces. Ces organes se sont formés pour la plupart à la surface du substratum, où ils se montraient vers le vingtième jour comme de petits points grisâtres, qui grossissaient et prenaient, après cinquante à soixante jours, l'aspect et la dimension de petites têtes d'épingle noires, semées irrégulièrement à la surface de la gelée d'amidon, au milieu de quelques maigres pinceaux verts (Pl. XIV, fig. 23).

Brefeld semble avoir constamment observé ses sclerotes dans la profondeur du substratum. Nous en avons vu aussi se former quelques-uns au fond de nos vases de culture, où ils étaient visibles à travers la paroi de verre. Mais ceux-ci étaient toujours peu nombreux, la plupart du temps réunis par deux ou trois, et souvent même soudés ensemble. Comme leur structure ne différait en rien de ceux de la surface, nous ne nous occuperons que de ceux-ci.

Nous avons observé commodément les diverses phases de la formation des périthèces sur la paroi des flacons de culture. Dès l'apparition de points noirâtres, nous avons enlevé avec une spatule de platine les plaques d'empois chargées de ces formations. En les étalant sur un porte-objet, et en examinant les préparations ainsi obtenues (1), nous avons des périthèces à tous les stades.

(1) On peut se servir comme liquide d'inclusion, de la liqueur de Ripart, ou mieux, après déshydratation, du salicylate de méthyle. Ce dernier a

Nous décrirons avec détails les premiers stades de cette formation, car nos observations ne sont pas tout-à-fait conformes à celles de Brefeld.

Nous avons vu que dans les endroits où allaient se former des périthèces, les branches du thalle prenaient un diamètre plus considérable que celles des régions stériles, et qu'elles étaient formées de cellules courtes (1,5 à 2 sur 1), dont les parois étaient colorées en brun. Les cellules du reste du thalle étaient au contraire longues et incolores (Pl. XVI, *fig. 32*).

Pour former un périthèce, deux branches du thalle se réunissent. Tantôt elles vont à la rencontre l'une de l'autre, comme l'a figuré Brefeld; tantôt elles cheminent parallèlement sur une certaine longueur, ainsi que nous l'avons souvent constaté. Elles s'enroulent l'une autour de l'autre, de façon plus ou moins régulière, et se mettent aussitôt à se colorer davantage et à se cloisonner. Il se forme ainsi un petit corps jaune-brunâtre, dans lequel il est difficile de distinguer les deux branches formatrices. On remarque que chacune des branches formatrices (quelquefois une seule ?) a émis latéralement des ramuscules (*fig. 33 f*), qui sont destinés à venir s'appliquer sur le petit tubercule produit antérieurement. La paroi foncée du corps ainsi formé est constituée par des cellules polyédriques à membranes épaisses (Pl. XVI, *fig. 33 à 37*).

A partir de ce moment, il continue à s'accroître, ainsi qu'en témoignent plusieurs de ces corps de dimensions différentes, que l'on peut voir dans les préparations à côté des stades précédemment décrits. Il s'en trouve assez souvent de lobés, formés par la condescence de deux ou trois de ces corps arrondis; de telles formes ont aussi été figurées par Brefeld.

Nous avons examiné le contenu de quelques-uns de ces périthèces; à la fois par écrasement dans l'hématoxyline, et par la méthode des coupes en série après inclusion dans la paraffine. Nous avons constaté ainsi, dans les périthèces moyennement développés (0^{mm}15) la constitution suivante, qui correspond exactement à celle que Brefeld leur a décrite et figurée :

l'avantage de rendre le substratum si transparent qu'il devient tout à fait invisible, condition très favorable à l'observation nette des thalles du *Champignon*.

Extérieurement, deux à trois couches de cellules à parois portant une zone d'épaississement colorée en brun-noir, et interrompues par de larges ponctuations au fond desquelles subsiste une mince membrane. Ces cellules sont polygonales, allongées tangentiellement. Au-dessous de cette assise, se trouvent plusieurs couches de cellules isodiamétriques ou même allongées radialement, sans méats avec parois de plus en plus minces vers l'intérieur du périthèce (Pl. XVI, *fig.* 38).

Le contenu des périthèces, occupant à peu près la moitié de leur diamètre, est formé d'un parenchyme à petites cellules polygonales, portant de place en place ces groupes de cellules en rosettes (*Rosetten*) que Brefeld décrit comme devant former les rameaux porteurs d'asques.

Dans les périthèces plus développées, l'écrasement ou les coupes un peu épaisses révélaient la présence d'asques ovoïdes, avec cinq ou six spores lenticulaires dans chacun; ces asques étaient groupées aux extrémités de ramuscules émanés d'un rameau axial. Il y avait plusieurs de ces rameaux dans chaque périthèce (*fig.* 39).

Enfin, dans les plus anciens périthèces, on voyait des débris d'asques avec une multitude de spores lenticulaires.

Nos observations s'éloignent donc de celles du botaniste allemand par ce fait que les cellules provenant de la réunion des deux rameaux (ascogone et pollinode de Brefeld) nous ont paru s'épaissir précocement, avant la cortication par les rameaux enveloppants. Peut-être cette divergence n'est-elle due qu'à la différence des conditions dans lesquelles nous avons observé la production des périthèces (1).

(1) Van Tieghem a observé des faits analogues pour les périthèces des *Chaetomium*, dont le mode de formation diffère suivant la nature du milieu nutritif. (*Développement du fruit des Chaetomium*, in Bull. Soc. Bot. Fr., 1876 et 1877).

IV. — Influence de quelques substances sur le *Penicillium glaucum*.

Nous avons vu que le *Penicillium glaucum* présentait dans les différents milieux des formes végétatives très-différentes ; elles sont dues à ce que la plante doit dans chaque cas s'adapter à des conditions biologiques diverses.

Parmi les conditions qui semblent, d'après les expériences qui précèdent, influencer sur la forme et la croissance du Champignon, nous avons vu que l'on peut placer en première ligne les variations de la réaction neutre ou acide du substratum. L'étude de l'influence que peut avoir sur les Champignons certains sucres qu'il rencontre dans les matières alimentaires sur lesquelles il se développe nous a paru également d'intérêt.

INFLUENCE DES ACIDES. — Parmi les acides dont l'action nous a paru intéressante à étudier, il en est deux, l'*acide tartrique* et l'*acide oxalique*, dont le rôle est prépondérant. L'acide tartrique, en effet, est celui qui donne au liquide de Raulin cette réaction acide qui s'oppose au développement des bactéries. L'acide oxalique se produit par le fait même de la végétation de la plante (2), et son accumulation dans le liquide est nuisible à la végétation du Champignon. Duclaux a remarqué que celui-ci pousse mieux quand on ajoute au milieu nutritif un sel de chaux qui neutralise l'acide au fur et à mesure de sa formation (1), et nous avons montré que le *Penicillium* développé dans certaines conditions, par exemple dans l'intérieur des œufs d'oiseaux, transforme une partie de la surface interne de la coquille en oxalate de chaux (2). L'acide oxalique agit donc, à l'égard de la plante qui l'a excrété, comme un toxique dont nous avons voulu étudier l'influence sur le développement du thalle.

(1) Gayon, cité par Duclaux (Encycl. Chim. de Frémy, t. IX, 1^{re} sect., ch. XVII).

(2) Duclaux, loc. cit.

(3) F. Guéguen. *Contribution à l'étude des moisissures des œufs*, (Bull. Soc. Mycol. Fr., 1898)*

Enfin, nous avons fait quelques expériences sur l'action des acides minéraux.

Acide tartrique. — Plusieurs matras, garnis de volumes égaux de liquide de Raulin renfermant des quantités croissantes d'acide tartrique, ont étéensemencées simultanément et également. Les quantités d'acide étaient :

Matras <i>a.</i> — Raulin ordinaire	Matras <i>d.</i> — Raulin 8 fois plus
témoin.	acide.
— <i>b.</i> — — à double	— <i>e.</i> — — 10 fois plus
dose d'a-	acide.
cide.	— <i>f.</i> — — 20 fois plus
— <i>c.</i> — — 4 fois plus	acide.
acide.	

Le développement était le même dans les matras *a* et *b*.

En *c*, il s'est produit un gros thalle floconneux, flottant, et formé de gros boutons hémisphériques, ayant une grande tendance à rester séparés les uns des autres. Les fructifications ont apparu à la fin de la deuxième semaine ; elles étaient formées de conidiophores à stérigmates verticillés, avec des files de trois à quatre conidies incolores, de 6μ de diamètre environ.

En *e*, de faibles flocons ont commencé à paraître vers le troisième jour seulement. Pendant trois semaines ils ont augmenté ; ils affleuraient en partie la surface du liquide, et en ces points avaient l'aspect de croûtes blanches, formées de filaments renflés par places en articles ovoïdes. Il y avait aussi quelques rares fructifications en ombelles à sept ou huit stérigmates simples, avec cinq ou six conidies hyalines au sommet de chaque stérigmate.

Toutes les membranes des filaments submergés renfermaient de l'amidon soluble, particulièrement abondant dans les cellules les plus dilatées (à rapprocher de la végétation, décrite plus haut, rencontrée dans la solution acide de chlorure de baryum). Au bout de deux mois, les thalles ne forment plus qu'un seul paquet, d'un *blanc légèrement rosé*, et relevé en dôme au-dessus du liquide. La coloration rosée réside dans les conidies, qui ont environ 6μ de diamètre.

Des conidies de ce thalle, réensemencées sur du liquide de Raulin normal, donnent des *Penicillium* normaux, à conidies

glaucques. Celles que nous avons réensemencées sur milieu 10 fois plus acide y ont germé plus vite que sur le liquide normal et surtout que sur le liquide 4 fois plus acide. Après deux jours, en effet, les nouveaux matras à liquide 10 fois plus acide sont déjà couverts d'un piqueté blanc ; après dix jours, on y voit des thalles de près d'un centimètre de diamètre, très-proéminents au-dessus du liquide qu'ils semblent fuir ; ces thalles sont colorés en *rose-chair*. Leurs conidies roses sont portées par des hyphes dont nous avons figuré quelques-unes (Pl. XV, *fig.* 24). Ces conidiophores, au lieu de présenter l'aspect abondamment ramifié de ceux du *Penicillium* normal, se font remarquer par la rareté de leurs stérigmates. Ceux-ci sont généralement au nombre de trois ou quatre. Ils sont souvent rétrécis en fuseau à leurs deux extrémités, et quelquefois dépourvus de conidies (*b*). L'hyphe sur laquelle ils sont insérés est toujours renflée assez fortement au-dessous d'eux ; quelquefois même cette dilatation donne au conidiophore un aspect aspergilliforme ; les stérigmates peu nombreux localisés au pôle supérieur du renflement, et le pied étiré en cône allongé, complètent la ressemblance (*f*). J'ai vu quelquefois la conidie terminale d'une file s'étirer en longue pointe effilée en forme de flamme (*e*).

Dans le renflement des conidiophores, l'eau iodée ne décelait point d'amidon ; seules les grosses cellules des filaments submergés bleuisaient sous l'action de ce réactif.

En *f* (liqueur 20 fois plus acide), la végétation a commencé le cinquième jour, en donnant des touffes semblables à celles qui flottent dans les solutions concentrées d'acide tartrique.

On voit que l'acide tartrique n'empêche pas la végétation du *Penicillium*, mais qu'il peut y introduire, s'il se trouve en trop grande quantité dans le milieu nutritif, des modifications intéressantes surtout les organes de fructification, et portant à la fois sur leur couleur et sur leur forme.

ACIDE OXALIQUE.—Les expériences ont été conduites de la même manière. Voici, en résumé, les résultats auxquels nous sommes arrivés :

Acide oxalique à 2 p. 1000.—Développement un peu retardé.

3 p. 1000.— id.

1 p. 1000.—La germination est retardée de

deux jours environ, et la culture, au moins dans les trois ou quatre premiers jours, est moins prospère que sur les liquides précédents.

5 p. 1000. — Germe seulement après 3 jours. Le septième jour, faible voile blanc. Fructification au dixième jour.

6 p. 1000. — Un jour de retard sur le précédent.

7 — } Le développement est à peu près le même que sur
8 — } les précédentes solutions, mais d'autant moins
9 — } rapide que la concentration est plus grande.

10 — } Les thalles développés au bout de trois semaines
11 — } ne sont pas cohérents.
12 — }

15 p. 1000. — Ne commence à donner des thalles bien nets qu'à partir du huitième jour. Le thalle, au bout de trois semaines, consiste en petites boules clairsemées, d'un *jaune-paille*. Il est formé d'hyphes intriquées, courtes, à formes tourmentées, et d'un diamètre un peu moindre que celui des hyphes ordinaires. *Pas de fructification*.

20 } Ont germé seulement vers le quinzième jour ;
25 } puis le développement est extrêmement
lent ; au bout de trois semaines, il n'y a encore à la surface du liquide qu'une faible
poussière, formée de thalles en rosette, dont
les éléments sont à peu près semblables à
ceux provenant du ferrocyanure de potassium (1).

ACIDES MINÉRAUX. — Nous avons étudié parallèlement l'action des acides sulfurique, azotique et chlorydrique.

Plusieurs séries d'expériences ont été faites.

1° Sur Raulin stérilisé, additionné après refroidissement de 2 pour 1000 (en poids) de chacun de ces acides, j'ai obtenu une *accélération dans l'apparition des thalles*. (Nous verrons que ce phénomène n'est pas entièrement attribuable, comme on pour-

(1) Lendner. *Variations de quelques Champignons sous l'influence des conditions de milieu* (Thèse de Genève, 1897), a trouvé une limite un peu supérieure à celle-ci pour le développement du *Botrytis cinerea* sur l'acide oxalique.

rait le croire, à l'hydrolyse par l'acide du sucre de canne contenu dans le liquide).

2° Une seconde série d'expériences a porté sur des liquides plus riches en acide (4 pour 1000).

Sur les trois acides, la plante a eu au début un développement plus lent que sur le témoin. Ainsi, les matras acidifiés ne contenaient encore que quelques points blancs alors que le témoin était déjà couvert de gros flocons.

Cinq jours après, les cultures acides compensent leur retard, sauf celles sur l'*acide sulfurique*, et verdissent. Au bout de dix jours, elles présentent l'aspect suivant :

Acide chlorhydrique : Beau verdissement au centre des mamelons du thalle.

Acide azotique : Verdissement moins intense.

Acide sulfurique : Pâs de verdissement.

Tandis que sur les acides azotique et sulfurique le thalle a la forme parcheminée et cohérente, sur l'acide chlorhydrique, où il s'est développé et a verdi le plus vite, il est resté en îlots bien séparés, quoique vigoureux et très-verts.

Influence de l'hydrolyse. — Comme les acides minéraux avaient hydrolysé en partie le saccharose dissous dans le liquide nutritif, nous nous sommes proposé de rechercher si la rapidité plus grande de développement observée dans les liqueurs faiblement acidifiées n'était pas uniquement dû à l'intervention du sucre.

Dans ce but, nous avons préparé les liquides nutritifs suivants :

<i>a.</i> — Raulin sucré au sucre candi.	<i>c.</i> — Raulin lévulosé.
<i>b.</i> — Raulin avec glucose et lévulose en parties égales.	<i>d.</i> — Raulin glucosé.

Tous ces sucres étaient pris en poids moléculaires égaux, pour rendre les résultats aussi comparables que possible.

Nous avons alors réparti des volumes égaux de ces liquides dans plusieurs matras; après stérilisation, nous les avons commencés avec des volumes égaux d'une même émulsion de conidies. Les résultats obtenus en observant journellement les cultures sont consignés dans le tableau suivant :

JOURS	a. SACCHAROSE	b. GLUCOSE-LÉVULOSE	c. LÉVULOSE	d. GLUCOSE
2...	Nuages légers à la surface et dans la profondeur.	Nuages au fond, grumeaux à la surface.	Comme sur <i>b</i> , mais moins marqué.	Comme sur <i>c</i> , mais moins marqué.
3...	Voile grenu complet, peu épais.	Nuages avec mamelons blancs, très-gros, très-nombreux.	Id.	Id.
4...	Id.	Progrès très-rapides.	Id.	Id.
5...	Mamelons blancs réunis en amas, surtout au milieu.	Mamelons verdissant nettement.	Id.	Comme sur <i>c</i> , mais verdissement presque nul.
6...				
7...				
8...	Tapis feutré blanc.	Vert presque partout.	Vert seulement au centre des ilots.	A peine vert au sommet des mamelons.
9...	Id.	Vert plus accentué	— Plus marqué mais moins qu'en <i>b</i> .	— Moins encore que sur <i>c</i> .
10...	Quelques taches vertes très faibles.	Vert foncé sur toute la surface.	Vert foncé au centre des ilots, petit liseré blanc.	Vert moins foncé que <i>c</i> , mais plus uniforme.
11.	— A partir du onzième jour, les cultures ont toutes le même aspect.			

De ces essais, nous concluons que c'est sur le mélange glucose-lévulose que le développement se fait le mieux ; ensuite viennent, par ordre décroissant, le lévulose, le glucose, et enfin le saccharose.

Mais comme à partir du 9^e au 11^e jour, dans les conditions de température de l'expérience (+10° à +16°), la croissance sur le saccharose est la même que sur le sucre interverti, on peut en conclure que le *Penicillium* forme surtout un ferment inversif à partir de ce moment.

Nous avons étudié également le développement du Champignon sur le lactose et les deux sucres provenant du dédoublement de celui-ci. Voici les résultats auxquels nous sommes arrivés :

JOURS	TÉMOIN (SACCHAROSE)	a. LACTOSE	b. GLUCOSE	c. GLUCOSE GALACTOSE	d. GALACTOSE
1...	Germination nette	Germination nette.	Germin. nette.	Germin. nette.	Germination faible.
2...	Très-faibles touffes blanches.	Touffes <i>bien plus petites</i> que sur témoin.	Un peu plus que sur le témoin.	Encore plus marqué que sur <i>b</i> .	Comme sur <i>c</i> .
4...	Touffes hémisphériques blanches.	Resté presque stationnaire, faible pellicule à la surface (comme sur le témoin après 36 heures). Rares colonies submergées, hyalines.	Touffes blanches, un peu plus abondantes que sur le témoin.	A peu près comme sur <i>b</i> , mais verdissement faible.	Comme sur <i>c</i> , mais un peu moindre. Verdissement <i>plus net</i> .
5...	Coussinets lenticulaires encore blancs.	Début de petits coussinets, gros comme des têtes d'épingle.	Grosses touffes blanches.	Comme en <i>b</i> , mais plus grosses, et commençant à verdier.	Verdissement très-marqué.
6...	Coussinets toujours blancs.	Faible voile, <i>commence à verdier</i> un peu.	Touffes un peu verdissantes.	Touffes plus vertes que sur <i>b</i> .	Verdissement augmentant très-faiblement
8...	Nappe blanche continue, à faibles points verdâtres.	Voile un peu plus épais, mais fragile, et très-vert.	Gros tomentum blanc, avec ilots nettement verts.	Maximum de développement Plus vert encore que <i>b</i> .	Id.
9...	Verdissement bien net.	Stationnaire.	Id.	Id.	Id.

A partir du dixième jour, le développement est identique sur tous, sauf sur le lactose, où il n'y a toujours qu'un mince thalle non ridé, d'un vert très-foncé.

Après le 25^e jour, les cultures *b* et *c* sont grisâtres comme toutes les vieilles cultures. Seule la culture sur galactose n'est pas encore entièrement verte. La culture sur lactose est restée stationnaire.

On voit que c'est sur glucose-galactose que le développement semble se faire le plus rapidement et le plus abondamment. Sur le lactose, on constate que le thalle, à peine apparu, verdit sans presque s'accroître, de sorte qu'il y a une différence frappante entre son volume et celui du Champignon qui a poussé sur les autres milieux.

Le *Penicillium* se développe bien plus lentement sur le glucose, car nous remarquons combien le verdissement qui marque la maturation des conidies y est lent à apparaître. Enfin, comme nous l'avons constaté précédemment sur les cultures avec les produits du dédoublement du saccharose, on voit ici les thalles devenir uniformes à partir du 8^e au 9^e jour, sauf naturellement pour le lactose, sur lequel le développement se fait brusquement sans paraître vouloir se continuer (1).

Ces expériences préliminaires étant faites, nous pourrons étudier l'action des acides minéraux sur le Champignon indépendamment de leur action hydrolytique.

Pour cela, nous opérerons nos cultures parallèlement sur des liquides glucosés et des liquides sucrés, additionnés les uns et les autres de 4 pour 1000 des acides à expérimenter.

Tout d'abord, on remarque que sur les liquides tant sucrés que glucosés qui ont été acidifiés par l'acide sulfurique, on ne voit, au bout de trois jours, que de petits points blancs, tandis que sur les autres il y a déjà des coussinets assez larges. Ces différences ne font que s'accroître avec le temps. En second lieu, les thalles, sur les milieux au glucose, sont encore d'un

(1) Cette difficulté de développement du *Penicillium* sur les milieux au lactose l'empêche d'envahir les cultures de *Mucor* faites sur le liquide de Gérard, qui est à base de lactose. (Gérard, *Sur les Cholestérines des Cryptogames*. J. de Ph. et de Ch. 1895).

blanc de neige au bout de seize jours, tandis que sur les milieux sucrés ils ont commencé à verdier à cette date (présence du lévulose). Au bout de ce temps, voici les différences que l'on remarque dans les cultures sur glucose :

Acide chlorhydrique. — Les cultures sur ce milieu sont les plus vigoureuses. Elles proéminent beaucoup au-dessus du liquide, et le verdissement apparaît en premier lieu, avec bien plus d'intensité et d'uniformité que sur les autres acides.

Acide nitrique. — Le verdissement se fait avec vingt-quatre heures de retard sur le précédent liquide ; les cultures sont aussi un peu moins luxuriantes.

Acide sulfurique. — Les cultures sont ici peu vigoureuses. Elles sont formées seulement de petits îlots arrondis, maigres, non soudés en voile comme dans les autres cultures, et ne recouvrant qu'une partie de la surface des matras. Même après six semaines, elles sont encore blanches.

L'observation de ces trois séries de cultures nous montre deux choses : d'abord que l'acide chlorhydrique paraît activer le verdissement, c'est-à-dire la maturation des conidies. Ce fait est-il à rapprocher de l'action accélératrice du chlore sur la germination des graines ? Ensuite, l'acide sulfurique paraît, s'il existe en certaine proportion dans le liquide nourricier, exercer une action fâcheuse sur le développement du *Penicillium*.

Pour nous rendre compte des limites de son action nocive, nous avons pris l'un des ballons à liquide sulfurique qui contenait une culture souffreteuse d'environ trois semaines. Le volume du liquide qu'on y avait introduit était de 20 centimètres cubes.

Nous l'avons additionné de dix centimètres cubes d'eau stérilisée ; puis nous avons laissé les choses en l'état. Après une semaine, la culture n'avait ni progressé ni verdi.

Nous avons alors ajouté de nouveau dix autres centimètres cubes d'eau ; deux jours après cette nouvelle addition, le verdissement a commencé à apparaître sur quelques points ; pendant les jours suivants, il a manifestement augmenté. Le contenu des ballons non étendus d'eau était demeuré stationnaire.

Nous croyons pouvoir conclure de cette expérience que l'acide

sulfurique, à la dose de plus de 2 grammes par kilogramme de liquide nutritif, agit dans le même sens qu'une trop grande acidification par les acides organiques. Il est probable que les autres acides minéraux ont une action analogue, lorsqu'ils se trouvent à un certain degré de concentration ; mais les doses auxquelles ils peuvent produire cette action sont certainement bien plus élevées que pour l'acide sulfurique.

Nous avons examiné au microscope les diverses parties du thalle qui avait poussé sur l'acide sulfurique. Les conidiophores ont été trouvés renflés au sommet et couronnés de cinq ou six stérigmates portant des files de conidies peu abondantes ; en somme, l'aspect était celui des conidiophores qui ont poussé dans des circonstances défavorables.

En résumé, les acides, tant organiques que minéraux, sont nocifs pour la plante à une certaine dose, variable pour chaque acide.

Employés à une très faible concentration ($\frac{1}{1000}$), les acides minéraux paraissent avoir une influence accélératrice sur la germination et le début du développement. A une dose plus forte, ils les ralentissent. A dose encore plus élevée, ils produisent des modifications profondes dans la structure du thalle. Nous résumerons ici l'ordre dans lequel les modifications semblent se produire, à mesure que l'acidité augmente :

1° Coalescence des basides et des stérigmates, qui se rapprochent en verticilles au sommet des conidiophores (aspect digité).

2° Disparition des basides ; les stérigmates sont directement insérés sur le conidiophore et renflés. Décoloration ou anomalie de coloration des conidies (teintes jaunes ou rosées).

3° Renflement du conidiophore à son sommet (aspect aspergilliforme) ; raréfaction des stérigmates et des conidies.

4° Déformation des cellules du thalle, surtout de celles qui émergent et qui prennent des formes globuleuses, en même temps que des dimensions très inégales.

Nous parlerons plus loin, dans l'étude des contenus cellulaires, du *Penicillium*, des modifications dans la constitution de la cellule.

ACTION DES SELS DE POTASSIUM (1).— Pour voir quelle pouvait être l'influence de ce métal sur le développement des mycéliums, nous en avons fait des cultures comparativement en milieux potassiques et sodiques.

Nos expériences ont porté à la fois sur les conidies de *Penicillium* et sur celles d'*Hormodendron*.

Nous avons comparativementensemencé ces organismes sur les milieux suivants :

Raulin ordinaire.

Solution de bromure de potassium, gélatinisée à $\frac{1}{20}$.

— d'acétate de potasse, —

Liqueur de Fowler, —

et sur les mêmes liquides, où les sels de potassium étaient remplacés par des poids équivalents de sels de sodium.

Nous avons remarqué que la nature du métal du sel ne paraissait pas influencer sur la coloration et le développement des cultures. Nous remarquerons en passant que les semis sur milieux arsenicaux sont restés stériles, ce qui confirme le fait indiqué plus haut, que la contamination de la liqueur de Fowler n'a pas lieu par les *Hormodendron*.

Nous avons égalementensemencé le *Penicillium* sur du liquide de Raulin aux sels de soude. Nous avons vu que la culture s'y faisait beaucoup plus lentement et plus mal qu'en présence des sels de potasse. Le liquide à la surface duquel flottent les maigres thalles ainsi obtenus est fortement coloré en brun, comme cela se produit souvent lorsque le *Penicillium* est cultivé sur des liquides peu favorables à son développement, ou épuisés de leurs substances nutritives, ou qu'il y est gêné par quelque antiseptique. Nous reviendrons plus loin sur ce fait.

Au bout de trois à quatre semaines, les cultures donnent bien des conidies, mais celles-ci restent incolores ; le thalle devient jaune sale de place en place. Les fructifications sont avortées ou très-mal développées, avec des conidiophores vari-

(1) Nageli, Untersuchungen ueber niedere Pilze, Munich, 1882.

queux et renflés en ampoules de formes bizarres, au sommet desquelles stérigmates et conidies sont souvent absents ou peu reconnaissables (Pl. XV, *fig.* 20). Les conidies sont par files de deux ou trois, au lieu de vingt et plus, comme sur le liquide de Raulin normal.

On voit que l'absence des sels potassiques, non-seulement empêche la glaucescence des conidies, mais encore rend très-pénible le développement de la plante.



V. — Action de divers antiseptiques sur le *Penicillium glaucum*.

La fréquence avec laquelle on rencontre le *Penicillium* dans les liquides les plus divers, à l'exclusion presque complète d'organismes appartenant aux genres voisins, montre que cette moisissure offre une résistance exceptionnelle à l'action nocive que la plupart des substances en dissolution exercent sur un grand nombre de végétaux inférieurs. En raison de ce fait, il nous a semblé utile d'étudier la manière dont le Champignon se comporte vis-à-vis des substances dites antiseptiques, et, dans la mesure du possible, de déterminer à quelle dose chacun de ces corps peut entraver la germination des conidies.

Dans des recherches analogues, on a quelquefois employé comme sols nutritifs des milieux solides, tels que la carotte et la pomme de terre, en ajoutant à ces substratums un certain nombre de gouttes d'une dissolution concentrée de l'antiseptique à étudier; onensemait ensuite à l'aide d'une anse de platine chargée de conidies. Cette méthode offre l'inconvénient de rendre incertaine la répartition régulière de l'antiseptique ainsi que des conidies; de plus, la masse de celles-ci peut varier d'un ensemencement à l'autre dans des proportions assez considérables. Nous avons préféré faire nos cultures sur le liquide de Raulin, réparti en volumes égaux dans des matras d'Erlenmeyer de même capacité, puis ensemencé avec un même nom-

bre de gouttes d'une même émulsion de conidies dans l'eau stérilisée. Les antiseptiques les plus actifs étaient ajoutés sous forme de solutions titrées, d'une concentration telle que le volume de celles-ci fût négligeable par rapport à la masse totale du liquide nutritif dans lequel on les avait versées.

Pour chaque série d'expériences, on se servait d'une émulsion de conidies préparée extemporanément. Un flacon-témoin, garni de liquide de Raulin pur, était ensemencé en même temps.

Nous n'avons pas prétendu assigner avec précision la dose exacte d'un antiseptique donné nécessaire pour empêcher la germination du Champignon dans les conditions de l'expérience. Outre que la détermination de tels chiffres, faite par approximations successives, eût nécessité un nombre d'expériences très-considérable, les résultats n'eussent pas offert un grand intérêt; l'expérience montre, en effet, que les doses utiles d'une même substance varient, toutes choses égales d'ailleurs, avec la nature du substratum, c'est-à-dire probablement suivant la force de résistance que celui-ci imprime à la plante; on conçoit même qu'il puisse exister des différences dans la résistance individuelle des conidies, suivant les conditions où elles ont pris naissance (1). Pour toutes ces raisons, nous nous sommes contenté d'indiquer les limites entre lesquelles chacune des substances étudiées paraissait agir.

Nous indiquons en quelques lignes, à propos de chaque agent antiseptique, les particularités auxquelles les cultures ont donné lieu; un tableau final résume les données numériques.

Nitrate d'argent. — Ce corps se réduisant rapidement sous l'influence combinée de la lumière et des substances organiques, nous avons fait comparativement des cultures en pleine lumière et à l'obscurité complète, ces dernières étant enfermées dans des boîtes de carton noircies intérieurement.

1 : 10000	}	Aucun signe de germination même après deux mois, avec ou sans lumière.
1 : 20000		

(1) C'est pour atténuer cette dernière cause d'erreur que nous avons toujours prélevé nos conidies dans des cultures sur pomme de terre arrivées au même degré de développement.

$1 : 30000$ } Vers le seizième jour, les conidies ger-
 $1 : 40000$ } ment; au bout d'un mois, les thalles sont
 bien développés, surtout dans la solution
 à $1 : 40000$.

$1 : 50000$. — Vers le douzième jour se montrent des filots qui grandissent assez rapidement, avec les caractères habituels du Champignon.

La dose antiseptique du nitrate d'argent est donc comprise entre $1 : 20000$ et $1 : 30000$. Le chiffre ainsi obtenu montre que le *Penicillium* est infiniment moins sensible à ce sel d'argent que l'*Aspergillus niger*, dont le développement, comme l'a montré Raulin (1) est entravé par $1 : 1600000$ de nitrate, et même par la culture dans un vase d'argent.

Biodure de mercure. — Ajouté aux cultures sous forme de solution aqueuse dans l'iodure de potassium, dont l'action à cette dose est nulle, comme l'ont montré des expériences comparatives, ce sel a donné les résultats suivants :

$1 : 50000$ } Aucune trace de germination, même au
 $1 : 100000$ } bout de six semaines.
 $1 : 150000$ }

$1 : 200000$. — Des thalles punctiformes se montrent sur le liquide, vers le 20^e jour. Au bout d'un mois, ils ont pris l'aspect glauque caractéristique; vers la sixième semaine, ils forment un voile continu.

La dose antiseptique est donc comprise en $1 : 150000$ et $1 : 200000$.

Bichlorure de mercure. — $1 : 10000$. — Rien au bout de six semaines.

$1 : 50000$. — Le Champignon, apparu vers la troisième semaine, continue ensuite à grandir, mais lentement, et moins que sur le biiodure à $1 : 200000$.

$1 : 100000$. — La germination n'est que retardée. Elle a lieu vers le septième jour, et le thalle ainsi formé est normal.

Le sublimé corrosif paraît donc avoir vis-à-vis du *Penicillium*

(1) J. Raulin. *Etudes chimiques sur la végétation. Recherches sur le développement d'une mucédinée dans un milieu artificiel*. (Ann. Sc. Nat. Bot. 1870).

un pouvoir antiseptique environ quatre fois moindre (entre 1 : 50000 et 1 : 10000) que celui du biiodure de mercure. Il est intéressant de remarquer que le rapport entre les pouvoirs antiseptiques de ces deux sels n'est pas proportionnel aux poids moléculaires du mercure entrant dans leur composition ; il est au contraire en rapport inverse. Les poids moléculaires du chlore et de l'iode (35.5 et 127) étant entre eux comme 1 est à 4, il en résulte que le pouvoir antiseptique le plus élevé appartient ici au sel qui contient le moins de mercure. Cela prouve que les sels sont antiseptiques par une qualité qui leur est propre, et non toujours d'après la nature et les proportions relatives de leurs composants. Il est probable aussi que la facilité avec laquelle le bichlorure de mercure est réduit par les corps organiques, même en milieu acide, s'oppose à ce qu'en solution étendue il conserve longtemps ses propriétés antiseptiques : c'est ce qui empêche d'obtenir avec ce sel des résultats utiles bien approchés. En tout cas, ce composé est bien moins actif vis-à-vis du *Penicillium glaucum* que de l'*Aspergillus niger*, pour lequel Raulin le dit toxique à 1 : 500000.

Gaïacol cristallisé. — Ajouté en dissolution dans l'alcool faible.

1 : 1000	}	Rien au bout d'un mois.
1 : 2000		
1 : 4000	}	Début de végétation du dixième au quatorzième jour ; la croissance s'effectue ensuite assez lentement, surtout sur 1 : 4000. Fructifications grisâtres ; liquide sous-jacent coloré en brun-madère.
1 : 8000		

La dose utile du gaïacol est donc de 1 : 2000 à 1 : 3000 environ (1).

Acide phénique cristallisé :

2 : 1000	}	Aucune trace de culture au bout de six semaines.
1 : 1000		
1 : 2000.		

(1) Boulanger-Dausse (J. Ph. et Ch. 1897, 6^e série, T. V) a trouvé, pour l'*Aspergillus fumigatus*, que le pouvoir antigerminatif était : sur pomme de terre de 9 à 11 pour 1000, et sur Raulin de 6 à 9 pour 1000.

mycéliums submergés, sous la forme de sphérules hyalines de deux millimètres de diamètre; elles croissent si lentement, qu'au bout de deux mois les plus grosses atteignent à peine deux centimètres.

L'acide phénique (1) n'entraverait donc la germination qu'à la dose d'environ 1 pour 1000.

Thymol (à saturation, c'est-à-dire à peu près à 3 : 1000) [Würtz] :

Les mycéliums se montrent vers le vingtième jour, et sont devenus cinq jours après de petits points blancs. La culture se continue péniblement, et reste à peu près stationnaire au bout de cinq semaines.

Menthol (à saturation; solubilité moindre que celle du thymol) :

Les thalles, qui ont apparu du vingtième au vingt-cinquième jour, sont encore blancs au bout de deux mois et demi; ils ne verdissent que vers la fin du troisième mois. Le liquide sous-jacent est de couleur madère.

Essence de menthe Mitcham (53 % de menthol), à saturation :

Le *Penicillium* apparaît au bout de dix-huit à vingt jours. Les thalles produisent vers le trentième jour des conidies glauques. Comme les choses se passent à peu près de la même manière sur liquide à demi-saturé de menthol, l'immunité relative dont jouit l'eau distillée de menthe à l'égard du *Penicillium* semblerait surtout due au menthol qu'elle contient.

Résorcine. — 2 : 100. — Aucun développement de moisissure, même au bout de six semaines.

1 : 100. — Apparition, vers le septième jour, de thalles pulvérulents formant un voile jaunâtre, et fructifiant le vingtième jour. Le liquide sous-jacent est coloré en brun madère. La dose utile de résorcine serait donc d'environ 2 : 100.

Salol à saturation (extrêmement peu soluble).

Les cultures apparaissent vers le septième jour, par consé-

(1) M. Boudier a vu se développer des filaments mycéliens dans une solution phéniquée à 0,5 pour 100 (Ch. Menier, cité plus loin), et Barnouvin (loc. cit. p. 79) signale dans l'eau phéniquée à 4 : 100, des mycéliums et des spores incapables de germer.

quent avec un léger retard ; mais leur développement est rapide, et le verdissement a lieu vers le quinzième jour.

Le salol, dans ces conditions, ne paraît donc jouir d'aucune propriété antiseptique (1).

Iodoforme (presque insoluble dans l'eau). — Le liquide de Raulin saturé de ce corps ne donne lieu à aucun développement de *Penicillium*, même au bout de six semaines (2).

Acide salicylique. — 1 : 1000 empêche toute culture.

Naphtol β . — 1 : 5000 empêche toute culture.

Camphre. — En liquide saturé (environ 1,15 : 1000), le développement débute vers le huitième jour, et continue avec un retard marqué par rapport au témoin.

En liquide saturé étendu de son volume de liquide nutritif, le développement retarde un peu au début sur celui du témoin ; mais la culture ne tarde pas à regagner son retard, et le champignon offre alors tous ses caractères habituels (3).

Acide borique. — 3 : 100. — Dans cette solution, qui est au titre habituel des solutions d'acide borique pour pansements, le développement de la moisissure se fait à peu près aussi vite et aussi bien que sur le témoin. Le mycélium se couvre de fructifications vers le sixième jour. Dans les solutions saturées (environ 4 p. 100), les choses se passent de même.

Pour essayer l'action de ce corps dans des milieux plus riches, nous avons préparé des milieux solides, en portant à 100° les mélanges suivants :

(1) Dans une première série d'essais, nos cultures se sont trouvées envahies par une levûre, probablement apportée par le salol lui-même ; de nouvelles expériences, faite après addition de salol liquéfié dans l'eau bouillante, ne donnèrent lieu à aucune contamination de ce genre.

(2) On a cependant signalé l'envahissement de la gâze iodoformée par une moisissure appartenant au genre *Cladosporium* (Ch. Ménier, J. de Ph. et de Ch. 1891, p. 442).

(3) Il est probable que le camphre n'empêche le développement des moisissures dans certains liquides (liqueur de Ripart) que par son association avec d'autres antiseptiques (acétate et chlorure de cuivre qui composent cette liqueur). Dans d'autres cas, il semble agir par les vapeurs qu'il émet (liqueur de Müller à la surface de laquelle on le dépose pour empêcher la moisissure d'envahir les pièces anatomiques).

α	{	Acide borique.....	1	b	{	Acide borique.....	1
		Amidon de p. de terre.	4			Amidon de p. de terre.	4
		Eau distillée.....	5			Eau distillée.....	2

Ces gelées très-consistantes, renfermant respectivement 1 : 10 et 1 : 5 en poids d'acide borique, étaient débitées en prismes ; ceux-ci, stérilisés dans des boîtes de Petri maintenues humides, étaient ensemencés en stries avec du *Penicillium*. Sur tous, on obtint des cultures à peu près semblables à celles que donnait l'empois d'amidon non boriqué. Le Champignon formait des traînées verdâtres envahissant bientôt toute la surface du substratum, parsemé de cristaux d'acide borique.

L'acide borique ne paraît donc jouir d'aucun pouvoir antiseptique à l'égard du *Penicillium*, pas plus qu'envers nombre de microorganismes vis-à-vis desquels il est considéré comme très-actif, et qui pullulent cependant dans les solutions de ce corps employées pour les usages médicaux.

Sulfate de cuivre. — 5 : 1000. — Germination retardée de quelques jours ; la culture se couvre d'un *Penicillium* rose-saumon, ayant les caractères du *Penicillium cupricum* Trabut (1).

10 : 1000. — Des points blancs, apparus au bout d'une semaine, n'ont encore donné après un mois et demi que des sphères hyalines floconneuses de 5 à 6 millimètres de diamètre. Au bout de plusieurs mois, ces thalles ont atteint environ un centimètre, quelques-uns, flottant à la surface, offrent de curieuses déformations de leurs conidiophores, renflés en ampoules irrégulières et sans conidies. Nous reviendrons sur ces anomalies à propos de l'étude des contenus cellulaires.

La dose antiseptique du sulfate de cuivre est donc beaucoup

(1) L. Trabut. *Sur un Penicillium végétant dans les solutions concentrées de sulfate de cuivre* (Bull. Soc. Bot. Fr., Janvier 1895). De Seynes a démontré que ce *Penicillium* n'était autre que le *P. glaucum* (Bull. Soc. Bot. séances des 12 et 26 juillet 1895).

(2) J. Beauverie (*Hygrocrocis et Penicillium glaucum* ; lu à la Soc. Bot. de Lyon, le 11 mai 1898) a obtenu un développement assez rapide de *Penicillium* dans du bouillon de viande additionné de 1 : 100 de sulfate de cuivre. Le Champignon lui a donné dans ces conditions des formes *Dematium*, que l'auteur rapproche comme nous des *Hygrocrocis*.

plus élevée pour le *Penicillium* que pour la plupart des Champignons inférieurs (3), et supérieure à 1 : 100 (4).

Le tableau suivant résume nos observations au sujet de l'action des antiseptiques sur le *Penicillium glaucum*. Les substances y sont rangées par ordre décroissant d'activité :

Biiodure de mercure..	=	Vers 1 : 200000
Bichlorure de mercure	=	Un peu plus de 1 : 50000.
Nitrate d'argent.....	=	De 1 : 30000 à 1 : 20000.
Iodoforme	=	à saturation.
Naphitol β	=	1 : 5000
Acide salicylique.....	=	Moins de 1 : 1000.
Gaïacol	=	Moins de 1 : 2000.
Acide phénique	=	Moins de 1 : 1000.
Sulfate de cuivre.....	=	Plus de 1 : 1000.
Résorcine ..	=	Vers 2 : 100.
Thymol.....	=	Ralentit l'envahissement, à saturation.
Menthol.....	=	Ralentit l'envahissement, moins que le thymol, à saturation.
Essence de menthe...	=	d°
Camphre.....	=	d°
Salol.....	=	d°
Acide borique.....	=	Paraît dépourvu de toute propriété antiseptique.

Nous pouvons conclure de ces expériences que le *Penicillium glaucum* semble plus résistant aux antiseptiques que la plupart des autres moisissures ; ce fait rend compte de la facilité avec

(3) L. Trabut (loc. cit.) indique 9,5 : 100 comme limite de la dose toxique pour le *Penicillium glaucum*. Mais il a fait ses essais avec le sulfate de cuivre très-impur destiné au sulfatage du blé De Seynes (Bull. Soc. Bot. Fr. 26 juillet 1895) dit que le *Penicillium glaucum* refuse de se développer, même après 35 jours, sur de la macération de blé additionnée de 5 % de sulfate de cuivre.

(4) Ravaz et Gouirand. — *Maladies de la Vigne* (Revue de Viticulture, T. VII, n° 170, mars 1897).

Raulin (loc. cit.) trouve que le sulfate de cuivre tue les conidies d'*Aspergillus niger* à 1 : 240 seulement.

laquelle il contamine les diverses solutions médicamenteuses, où nous avons vu qu'il se développe à l'exclusion presque totale des autres Champignons.

VI. — Recherches cytologiques sur le *Penicillium glaucum*.

(Pl. XVII).

Au point de vue des contenus cellulaires, et plus particulièrement des formations nucléiniennes, le *Penicillium glaucum* ne paraît avoir été étudié que par Strasburger (1) et par Dangeard (2). Il nous a semblé intéressant de reprendre cette étude sur le Champignon développé en différents milieux : de même que Strasburger, nous avons considéré comme *Penicillium* normal celui qui provenait de cultures sur pain humide.

Au début de nos recherches, nous nous sommes servi de matériaux soumis comparativement à l'action de divers fixateurs, qui tous nous ont présenté des inconvénients assez graves. L'alcool absolu, employé par Strasburger, contracte outre mesure le protoplasme, et souvent la cellule elle-même ; l'acide chromique, en solution à 1/2 ou 1 pour 100, rend les différenciations impossibles, et donne souvent au protoplasme un aspect grenu. L'acide osmique en vapeurs rend les noyaux difficilement colorables, et communique parfois à certaines régions de la cellule une réfringence spéciale qui rappelle celle des vrais noyaux. Nous avons donc reconnu préférable d'opérer toujours sur des cellules non fixées.

ETUDE DE LA MEMBRANE (fig. 44 et 45). — L'épaisseur de la membrane peut varier d'une cellule à l'autre et même aux divers

(1) Strasburger. — *Das Botanische Practicum*, léna, 1884, pages 429-430.

(2) P. A. Dangeard. — *Deuxième mémoire sur la reproduction sexuelle des Ascomycètes* (Le Botaniste, 5^e série, 6^e fascicule, 10 juillet 1897, p. 260). — *Du rôle de l'histologie dans la classification des Champignons* (Ibid, p. 315).

points d'une même cellule. Dans les filaments fins de la périphérie des vieilles cultures, sa minceur est telle qu'à peine lui reconnaît-on un double contour. Dans les articles plus gros, les cellules cylindriques ont une cloison de séparation plus épaisse que le reste de la paroi ; cette cloison forme assez souvent sur chacune de ses faces un ménisque concave ou convexe, dans lequel l'éclairage oblique et l'action de l'eau iodée ou de la résuline font parfois apparaître des stries d'accroissement.

Lorsque la plante s'est développée dans un milieu défavorable, par exemple trop acide ou additionné d'un antiseptique, il peut se produire un épaississement unilatéral : la cellule est souvent alors déformée en massue ou en sphéroïde ; l'épaisseur de la paroi augmente alors avec le diamètre de la cellule.

La membrane est simple dans toute l'étendue du thalle et du conidiophore. Dans les conidies, comme l'a montré Löw (1), elle est doublée d'une mince membrane interne, qui formera plus tard la paroi du tube germinatif.

La paroi conidiale est relativement épaisse (environ $\frac{1}{5}$ du diamètre total, dans la cellule au repos) ; elle est décrite comme lisse par tous les auteurs. Une observation attentive y fait cependant reconnaître en certains points des zones de renforcement très-peu saillantes à la surface, mais qui forment dans l'épaisseur de la membrane comme des segments alternativement clairs et obscurs (fig. 47). Faut-il voir là des craquelures régulières dans le dépôt cireux qui la recouvre, ou bien des modifications locales de constitution destinées à faciliter le gonflement de la conidie ? Cette dernière hypothèse nous paraît vraisemblable, car l'aspect des zones n'est pas modifié par des lavages à l'alcool ammoniacal, tandis qu'on ne retrouve plus cette apparence sur les conidies en germination, dont la membrane est homogène et lisse.

PROTOPLASME ET NOYAUX. — La connexion étroite qui existe entre l'arrangement du protoplasme et des corps que l'on s'accorde jusqu'ici à considérer comme des noyaux nous oblige à les étudier simultanément.

(1) E. Low. — *Zür Entwicklungsgeschichte des Penicillium glaucum* (Pringsh. Jahrbuch. t. VII, 4^e livre, pp. 472-510, 1870).

En colorant le Champignon à l'hématoxyline alcoolique, après fixation par l'alcool absolu, Strasburger a vu dans chaque cellule du conidiophore de nombreux noyaux très-petits, allongés suivant l'axe de la cellule, et reliés entre eux par de minces traînées de protoplasme ; il décrit aussi un ou deux noyaux dans chaque baside, un seul dans chaque stérigmate, vers l'extrémité supérieure, et un seul dans chaque conidie.

Pour reprendre cette étude, nous avons essayé successivement plusieurs colorants nucléaires. Nous avons remarqué que presque tous se fixaient sur les noyaux, mais souvent d'une manière peu ou pas élective ; parmi ces derniers, les verts (de méthyle, malachite, à l'iode), la safranine, l'orcéine, sont à laisser de côté, de même que les méthodes de coloration combinées. Les teintures d'hématoxyline préconisées par la plupart des auteurs, la picronigrosine employée par de Wèvre (1), donnent des résultats inconstants. Au cours de nos recherches, nous avons remarqué qu'il était toujours indispensable d'employer des liquides très-dilués, et de suivre au microscope les progrès de la teinture. On peut se servir de violet de gentiane très-étendu ou de violet dahlia (une à deux gouttes de solution aqueuse saturée pour 40 centimètres cubes d'eau). Mais le procédé de choix, auquel nous avons surtout eu recours, est celui dont Schmitz s'est servi pour l'étude du noyau des Algues, et que M. le professeur Guignard nous a fait connaître. Dans un verre de montre plein d'eau distillée on projette une trace d'hématoxyline en poudre, et l'on débouche au-dessus du liquide, pendant quelques instants, un flacon d'ammoniaque. (Il faut bien se garder de verser dans le verre la moindre goutte d'alcali, qui colorerait instantanément le liquide en rouge-violet ; de même, il faut éviter de faire agir la teinture sur des filaments non lavés, surtout lorsqu'ils ont été cultivés dans un milieu très-acide, sous peine de voir le colorant virer au jaune.)

Dès que le liquide commence à se teinter de violet-améthyste, on enlève le flacon d'ammoniaque, et l'on remue le contenu du verre de montre pour rendre la coloration uniforme. On dépose

(1) A. de Wèvre. — *Le noyau des Mucorinées*. (Bull. de la Soc. Royale de Bot. de Belgique, 1891, 1^{re} partie).

sur une lame une goutte de colorant, on y dissocie les filaments mycéliens (1), et l'on recouvre d'une lamelle large, que l'on borde exactement à la paraffine (2). La coloration est progressive, et devient complète au bout de quelques heures; on ensuit les progrès avec un bon objectif à immersion; les noyaux apparaissent colorés en violet, le protoplasme en gris de lin très pâle. Les préparations ne se conservent pas au-delà d'un jour et demi.

HYPHES RAMPANTES (fig. 40 à 49). — Tous les filaments sont plus ou moins vacuolaires. Les vacuoles apparaissent dans le tube germinatif avant le premier cloisonnement; elles naissent dans l'axe des cellules, sous forme de sphères bientôt ovoïdes et cylindriques dans les filaments fins à croissance peu active. Elles laissent subsister entre elles et la paroi une mince couche de protoplasme. Ces vacuoles paraissent manquer dans le conidiophore.

Dans tout le plasma, et surtout au pourtour des vacuoles, on voit de nombreux noyaux, sous l'aspect de corps sphériques, parfois isolés, souvent rapprochés par paires. Leur diamètre assez variable, surtout dans les gros filaments en voie de croissance rapide, est de $0\mu 5$ à 2μ ; ils sont entourés d'une aréole hyaline très-nette, dans laquelle ils sont comme suspendus. Cette aréole peut être colorée momentanément par l'éosine, lorsqu'on fait pénétrer dans la préparation une trace de ce colorant, qui ne tarde pas du reste à diffuser dans tout le protoplasme.

Certains de ces corps renferment dans leur aréole un très petit point, de signification énigmatique (fig. 49, *a*), qui se colore vivement en violet comme le noyau lui-même; ce corpuscule existe peut-être dans tous les noyaux, et ne se verrait

(1) Si l'on éprouve quelque difficulté à humecter les conidiophores, on les laisse séjourner quelques instants dans une eau faiblement ammoniacale, et on les lave avec soin avant de les colorer.

(2) Comme il est souvent utile de prolonger la coloration pendant 24 heures, nous trouvons avantageux d'occlure ainsi les préparations. Nous évitons ainsi le virage du colorant qui se produit rapidement en l'absence de lut, et qui est probablement dû à la fois à la volatilisation de l'ammoniaque et à l'action de l'acide carbonique de l'air.

alors que lorsqu'il se trouve placé sur un plan horizontal par rapport à l'observateur.

On voit, surtout aux cloisons de séparation, et très-généralement vers l'extrémité des tubes germinatifs, plusieurs de ces noyaux affecter une forme ovoïde ou en biscuit, quelquefois même avec leurs moitiés inégales; d'autres sont rapprochés deux à deux dans une même aréole, et allongés suivant la ligne des axes; ce sont là vraisemblablement des stades de division, qui paraît se faire suivant le mode direct, peut-être parce que la petitesse des noyaux ne permet pas de saisir les détails de la division indirecte (1) (fig. 49, *b*).

En colorant les filaments par l'éosine ou la rubine S, on voit que le protoplasme est finement granuleux. Les microsomes qu'il renferme, colorés à chaud par la fuchsine phéniquée, résistent à l'action ménagée de l'acide nitrique au $\frac{1}{10}$. Ce sont sans doute des corps analogues à ceux que l'on a décrit dans les Bactériacées sous le nom de *Corpuscules métachromatiques*.

CONIDIOPHORES (fig. 50). — Comme les autres cellules, celles qui forment le pied conidifère renferment des noyaux multiples, de dimension plus uniforme que dans les articles du thalle. Les gros noyaux *y* sont rares; les vacuoles font le plus souvent défaut.

Dans un certain nombre de conidiophores traités par l'hématoxiline acide, comme l'a fait Strasburger, nous avons rencontré des apparences analogues à celles qu'il y décrit comme noyaux allongés; cet aspect est dû à la diffusion du colorant autour de trois ou quatre noyaux rapprochés en file.

BASIDES. — Nous nommons basides les segments qui supportent immédiatement les stérigmates, en réservant ce dernier nom aux articles plus ou moins verticillés dont l'étranglement répété produit les conidies. Il existe dans ces basides plusieurs

(1) P.-A. Dangeard est d'avis contraire, du moins pour le noyau de la tête du stérigmate. « Cette division », dit-il, « semble se faire suivant le mode indirect; il est impossible de se prononcer sur le nombre des chromosomes » (*loc. cit.*, p. 315). Même aux grossissements les plus considérables, l'amas nucléinien, à tous les stades, nous a toujours paru homogène.

noyaux, comme dans les autres articles du thalle. De même que dans le pied, on n'y remarque ordinairement ni vacuoles ni gouttes d'huile.

STÉRIGMATES ET CONIDIES. — Strasburger ne décrit dans le stérigmate qu'un seul noyau vers l'extrémité supérieure; sa description se rapporte évidemment à l'organe complètement développé. Dangeard en indique au un centre du stérigmate, et un autre dans le renflement qui termine celui-ci (1). En examinant un grand nombre de stérigmates à divers états de développement, nous avons observé les faits suivants :

Le stérigmate apparaît, comme les autres articles du thalle, comme un bourgeon dans lequel s'engage un noyau qui se divise aussitôt. Au moment où se forme la cloison séparatrice, cet article offre l'aspect d'une cellule ovoïde, renfermant des noyaux en nombre très-variable (fig. 50, *a*). Dès que la tête du stérigmate commence à se dessiner, ces noyaux, vraisemblablement par fusion progressive, sont au nombre de deux; l'un est placé vers le centre de figure du stérigmate, l'autre dans le renflement apical.

Lorsque l'étranglement séparateur de la future conidie commence à s'accroître, le noyau apical et le noyau inférieur se montrent tous deux en voie de division : alors que celui de la tête est complètement divisé, celui du centre est en voie d'étranglement. La conidie qui surmonte la tête du stérigmate, et qui en est entièrement séparée par étranglement, ne renferme qu'un seul noyau (fig. 50, *e*, *f*).

Voici comment nous interprétons ces faits :

Le noyau de la tête du stérigmate, ou noyau apical *a*, se trouve,

(1) « Le nombre des noyaux, qui est assez élevé dans les articles du « thalle et dans ce filament (conidiophore), se réduit dans les rameaux « fructifères à l'unité; les cellules des branches qui forment le pinceau « n'ont qu'un noyau; ces branches sont terminées par des cellules-mères « supportant chacune un long chapelet de conidies; à l'intérieur de la « cellule-mère se trouve un noyau qui est en état de continuelle division; « cette division semble se faire suivant le mode indirect; il est impossible « de se prononcer sur le nombre des chromosomes; à chaque division, « un des nombreux noyaux s'engage dans une nouvelle conidie, formée « par étranglement » (P.-A. Dangeard, *loc. cit.*, p.235).

comme l'a vu Dangeard, en voie de bipartition. L'une de ses moitiés passe dans la future conidie, formée par la tête actuelle du stérigmate; l'autre moitié, que l'on voit assez souvent un peu plus bas que la précédente, est destinée à la conidie qui va se former aussitôt après. Mais au moment où celle-ci va se détacher, le noyau *b*, du centre du stérigmate, qui s'est accru et s'est divisé transversalement, a émis une autre masse nucléaire qui, se portant aussitôt au sommet du stérigmate, va s'y diviser en deux, et y apparaître sous cette forme, pour recommencer la série des phénomènes. Tous les noyaux des conidies proviendraient donc du gros noyau central du stérigmate; la bipartition instantanée du noyau *a* permettrait cette production rapide de conidies que l'on observe dans les jeunes conidiophores. Plus exactement, le temps écoulé pendant la division de *b*, l'arrivée du noyau-fille au sommet du stérigmate, et la bipartition de ce même noyau-fille correspondraient à la durée de formation de *deux* conidies (fig. 50, *g*).

Si, au lieu d'observer des stérigmates jeunes on s'adresse à ceux qui sont déjà couronnés d'une longue file de conidies, on voit le noyau central non pas étranglé, mais seulement un peu allongé (comme l'a vu Strasburger). Cette apparence s'explique par le fait qu'à ce moment la formation des conidies étant très-ralentie, le noyau n'a plus à se diviser qu'à de rares intervalles, et qu'alors l'observateur a toutes chances de le rencontrer à la période de repos ou tout au moins de division peu active (1).

CELLULES DU PÉRITHÈCE.—Ces cellules ont été décrites et figurées avec soin par Brefeld. Leur contenu est formé de plusieurs petits noyaux, tantôt uniformément répandus dans le protoplasme, tantôt rapprochés en une ou deux masses vers le centre de la cellule, suivant qu'il existe ou non dans celle-ci une grosse vacuole centrale.

(1) L'asymétrie dans la bipartition des noyaux, que nous avons fait remarquer déjà, s'observe surtout à un haut degré dans le noyau central du stérigmate. Il faut peut-être regarder ce phénomène comme un terme de passage entre les modes de division direct et indirect, comme il en a été signalé chez plusieurs organismes inférieurs.

Asques. — Nous n'avons observé que des asques jeunes, où les spores n'étaient pas encore formées, et des spores libres. Dans les asques, nous avons vu cinq à six petits noyaux semblables à ceux des conidies. Dans les spores, il nous a semblé voir plusieurs noyaux, mais les plis de la membrane rendaient l'observation si difficile que nous n'oserions nous prononcer.

RÉPARTITION DES NOYAUX PENDANT LA CROISSANCE. — Pour nous rendre compte du processus de formation et de distribution des noyaux à partir de la conidie, nous avons étudié des germinations sur le liquide de Raulin. Pendant les premières heures qui suivent le semis, la conidie gonfle jusqu'à tripler de volume. La membrane extérieure se perce en un point, et laisse sortir un tube mycélien, formé par la membrane interne. Au moment où celle-ci commence à faire hernie, le noyau de la conidie subit une première division (fig. 49, *a*). Pendant que le tube s'allonge, les noyaux-filles se divisent de nouveau : les uns s'engagent dans le filament, les autres restent dans la conidie afin de pourvoir à la formation d'un nouveau tube (fig. 49, *d*), qui se montre d'ordinaire seulement alors que le premier a déjà commencé à se cloisonner (fig. 49, *e*, *t*).

Un peu avant le premier cloisonnement, des vacuoles apparaissent dans le protoplasme de la conidie et de l'hyphe, sous forme de sphéroïdes à la périphérie desquels se placent les noyaux, qui sont surtout abondants dans les ponts de protoplasma. Ces petits corps, dès le début de la végétation, se montrent déjà de taille inégale. Il y en a d'ordinaire un très gros, en voie de division active, vers l'extrémité du tube. Les autres se montrent surtout abondants au voisinage des points où doit se former une cloison ou un rameau. Les ramifications apparaissent comme de petits renflements à protoplasme d'abord homogène, ayant à leur base un noyau volumineux (1), qui ne tarde pas à s'engager dans le jeune bourgeon pour s'y diviser aussitôt (fig. 49, *a*). L'un de ces noyaux-filles, situé vers le

(1) J. von Istvanffi (*Rôle du noyau cellulaire dans le développement des champignons*, résumé dans l'Année Biologique de Delage, 1897), a montré, dans d'autres espèces, que la ramification d'une cellule est intimement liée à la position du noyau.

sommet, présente d'ordinaire une dimension plus considérable. Assez souvent, de même que dans le filament germinatif, on le trouve en voie de division.

MODIFICATIONS DU CONTENU CELLULAIRE DANS LES DIVERS MILIEUX.— Lorsqu'on examine des filaments provenant d'une culture âgée dans le liquide de Raulin, et qu'on les compare à ceux qui se sont développés sur du pain ou dans du suc de fruits, on remarque que les noyaux y apparaissent plus petits et plus nombreux que sur les milieux normaux ; cette diminution de volume des éléments nucléaires tient peut-être à la fois à un épuisement partiel du milieu, et à la présence dans celui-ci des produits d'excrétion du Champignon.

Si l'on s'adresse à du *Penicillium* cultivé dans le même liquide additionné, par litre, de cinq à dix grammes de sulfate de cuivre, la croissance, qui a été très-ralentie, fournit un thalle formé de petites masses arrondies, peu cohérentes, colorées en rose pâle.

L'appareil végétatif est formé de filaments à cellules courtes, avec quelques vacuoles. Tout près de la surface du liquide et au-dessus de celle-ci, les cellules sont sphéroïdales, très-irrégulières, et d'un diamètre souvent dix fois plus considérable que celui des filaments. La paroi de ces cellules est d'épaisseur très-inégale (fig. 46, *b*). L'hématoxyline y démontre la présence de nombreux grains sans aréole, au milieu desquels on en voit deux ou trois à peine plus gros, aréolés. Nous avons vu parfois, dans de telles cellules, ces corps groupés en deux ou trois amas autour d'une vacuole centrale ; le protoplasme offrait alors une structure fibrillaire, mise en évidence par l'éosine ou le méthylorange.

En examinant des filaments qui s'étaient développés dans une solution acide de *chlorure de baryum*, nous avons trouvé des cellules augmentées de diamètre, et de forme très-irrégulière. Les membranes épaissies de ces cellules renfermaient de l'amidon soluble ; la coloration bleue donnée par l'iode était surtout intense dans les cellules très-renflées (fig. 45).

Le protoplasme de telles cellules est rempli de grosses

gouttes d'huile (1) (fig. 45, *h*) très-abondantes en certains points. Les noyaux (fig. 45, *n*) y sont peu nombreux, isodiamétriques, et presque tous rapprochés deux à deux. Ils sont surtout placés aux extrémités des cellules, et entre les gouttes huileuses. Celles-ci que l'on rencontre aussi, bien que moins grosses, dans les vieilles cultures de *Penicillium* en milieux normaux, prennent naissance dans l'axe du protoplasme ; elles se fusionnent peu à peu entre elles, après s'être étirées en larmes bataviques. Il arrive parfois qu'une cellule en est presque entièrement remplie, et qu'on ne peut y déceler de noyau. Cette huile, de couleur jaune pâle, se colore facilement par l'orcanette acétique et le bleu de quinoléine ; elle ne se colore presque pas par le violet de Paris, et brunit légèrement par l'acide osmique. Elle est soluble dans l'éther et le chloroforme, moins facilement dans le xylène ; elle paraît lentement soluble dans l'alcool absolu. L'ammoniaque et la potasse ne la saponifient pas ; traitée par l'acide sulfurique concentré, elle ne donne pas de cristaux bleus. Ce dernier caractère montre qu'elle ne doit pas être rapprochée des matières grasses que Zopf a décrit dans quelques Champignons sous le nom de *lipochromes*.

En résumé, les cellules du *Penicillium* nous apparaissent comme des articles contenant un protoplasme pariétal ou vacuolisé, à structure réticulaire, parsemé de nombreux corps arrondis, composés d'une partie centrale fixant avidement les colorants (2), et d'une partie périphérique ou aréole qui les isole du protoplasme.

Ces corps sont donc semblables à ceux que les histologistes ont désigné sous le nom de noyaux dans les Champignons inférieurs. Les réactifs indiqués pour la nucléine (chlorure de

(1) J. de Seynes (*Expériences physiologiques sur le Penicillium glaucum*, Bull. Soc. Bot. de France, 9 février 1872) a vu que l'huile se forme dans le thalle du champignon longtemps submergé. « Ces gouttelettes huileuses », dit-il, « sont d'égale dimension, d'un diamètre un peu moins grand que celui de la cellule qui les contient, et placées à la file, à une distance à peu près égale à leur diamètre ».

(2) Ce corps central correspond à ce que Léger appelle *nucléole* dans le noyau des Mucorinées. (M. Léger. *Recherches sur la structure des Mucorinées*. Thèse de la Fac. des Sc. de Paris, 1895).

sodium. phosphate de potasse. pepsine en solution acide, et à 37°) semblent, il est vrai, sans action sur ces petits corps. Mais on sait que la nucléine de beaucoup de noyaux offre également ces caractères négatifs. Il ne faut donc pas attacher trop d'importance à ces réactions microchimiques, ni refuser à ces corpuscules le nom de noyaux. Cette dénomination, d'ailleurs, se rapporte bien plus à leur fonction physiologique qu'à leur forme. Il se peut que chacune de ces sphérules ne soit autre chose qu'un grain de nucléine entouré de linine ou de suc nucléaire; mais il est possible également qu'il faille les regarder comme autant de noyaux distincts, car rien n'empêche, dans un organisme à développement aussi rapide, d'admettre l'existence de cellules plurinucléées, comme le fait se produit si fréquemment même chez les végétaux supérieurs.

VII. — Conclusions générales.

Les organismes mycéliens que l'on rencontre si fréquemment dans les solutions médicamenteuses ne paraissent pas devoir être rapportés à un grand nombre de genres et d'espèces de Champignons. Dans l'immense majorité des cas, ainsi que le prouvent les cultures, les flocons que l'on observe dans ces conditions sont constitués par le *Penicillium glaucum*, quelquefois mélangé d'organismes appartenant à des genres voisins. Bien que les cultures aient donné lieu, dans quelques cas, à un développement de Mucorinées, celles-ci, étant donnée la ténuité des éléments mycéliens des solutions, ne semblent point exister dans les liquides à l'état végétatif. Il nous paraît plus vraisemblable d'admettre que ces Mucorinées se trouvent accidentellement dans les solutions à l'état de spores ou de kystes, qui n'attendent pour germer que des circonstances favorables.

Les formes conidiennes que l'on rencontre au sein de quelques solutés, et que nous rapportons à un *Hormodendron*, ne sont peut-être que des états évolutifs du *Penicillium glaucum*. Nous n'avons pu, il est vrai, observer d'une manière constante et irréfutable la continuité de ces deux organismes ; mais nous avons obtenu des formes de passage de l'un à l'autre. Notre insuccès n'étonnera point ceux qui savent combien sont capricieux ces organismes inférieurs d'un polymorphisme si déconcertant.

Au cours de nos recherches sur ces mêmes formes *Hormodendron*, nous avons observé et décrit la formation et la structure de sclérotés à chlamydospores non signalés jusqu'ici. Nous avons également étudié la germination de ces kystes, et signalé l'existence de formations transitoires que nous nommons *circinules* ; ces productions semblent n'avoir pas d'équivalent chez les autres Champignons.

En ce qui concerne le *Penicillium glaucum*, nous pensons avoir établi que l'on peut ramener à ce type un certain nombre

de formes qui ont été décrites jusqu'ici comme espèces distinctes.

Etudiant le cycle évolutif de ce Champignon, nous y avons pu observer la formation de périthèces qui diffèrent de ceux décrits par Brefeld par leur taille plus réduite, leur situation à la surface du milieu nutritif, et enfin certaines différences dans leur mode de développement qui rappellent celles que Van Tieghem a observées sur le périthèce des *Chætomium*.

Les causes qui font varier l'aspect de l'appareil végétatif du *Penicillium* nous paraissent devoir être rapportées à des changements dans la composition du sol nutritif, ainsi qu'à la réaction acide, neutre, ou alcaline du milieu.

L'étude de l'action de divers acides minéraux et organiques, et de celle de plusieurs antiseptiques nous a montré qu'il existait aussi des substances douées d'une action toxique à l'égard de ce Champignon ; la résistance que présente le *Penicillium* à ces agents nocifs, comparée à celle qu'offrent plusieurs organismes des genres voisins, tels que l'*Aspergillus fumigatus* et l'*Aspergillus niger* nous expliquent pourquoi nous le trouvons si répandu dans les liquides réputés les plus antiseptiques.

Enfin, l'étude cytologique de cet organisme si répandu, en même temps qu'elle nous a permis de nous rendre compte du mode de formation des conidies, prouve que les modifications du milieu ambiant retentissent aussi bien sur la constitution intime du thalle que sur ses formes extérieures.

EXPLICATION DES PLANCHES.

PLANCHE XIII (Gros. 400).

- Fig. 1.— Végétation provenant d'une vieille solution d'acétate de potasse à $\frac{1}{5}$.
- Fig. 2.— Filaments des solutions de bromure de potassium. On y voit quelques cellules renflées à contenu brun (chlamydospores).
- Fig. 3.— *Hygrocrocis arsenicus* submergé, avec nombreuses chlamydospores.
- Fig. 4.— Formes observées dans une solution chlorhydrique de chlorure de baryum ; on voit de nombreuses gouttes d'huile dans les filaments.
- Fig. 5.— A gauche, hyphes observées dans une solution d'iodure de potassium à $\frac{1}{10}$; à droite, formes provenant d'une solution concentrée d'acide picrique.
- Fig. 6.— A gauche, végétation des solutions anciennes de chlorure de sodium ; à droite, de ferrocyanure de potassium.
- Fig. 7.— *Penicillium* flottant à la surface d'un liquide contenant de l'acide tartrique et de la magnésie.
- Fig. 8.— A gauche, mycélium du sulfate de quinine. A droite, sulfate de par-téine et autres sels alcaloidiques.

PLANCHE XIV (Gr. = 400, sauf la fig. 16).

- Fig. 9.— Anastomoses observées dans les cultures d'*Hormodendron* et de sclérotés noirs sur porte-objets, en milieux gélatinisés, au moment où les conidies vont apparaître.
- Fig. 10.— Une anastomose à deux états successifs.
- Fig. 11.— Culture de cinq jours d'*Hormodendron* sur porte-objet ; f. f., filaments qui vont s'élever dans l'air, pour y produire des *Hormodendron*.
- Fig. 12.— *Hormodendron* bien développé.
- Fig. 13.— Formes intermédiaires entre *Hormodendron* et *Penicillium*, tirées d'une culture de cinq jours, sur porte-objets, d'un *Hormodendron* provenant d'un ensemencement d'*Hygrocrocis arsenicus* sur blanc d'œuf.

Fig. 14.— Circinules. *e*, commençant à apparaître ; *a*, *b*, *c*, *d*, complètement développées ; *f*, déroulement d'une circinule.

Fig. 15.— Culture d'un *Hormodendron* (conidies d'inoculation noyées dans la gélatine nutritive). On suit, de *b* en *d*, le processus d'isolement des cellules dans la gaine de gélatine liquéfiée qui entoure les filaments.

Fig. 16 ($\frac{950}{1}$).— Deux circinules, après traitement par le vert de méthyle acétique. On y voit le protoplasma granuleux dans l'hyphe, fibrillaire dans la circinule.

PLANCHE XV (Gr. 400).

Fig. 17.— *Penicillium* dans une culture de huit jours sur porte-objet ; *n*, bord de la goutte de gélatine nutritive.

Fig. 18 à 26.— Formes pathologiques diverses.

18 et 19.— Sur un milieu solide à 50 0/0 d'acide borique (après 15 jours). — 20, sur Raulin sodique (après 18 jours). — 21 et 22, sur gélatine au Raulin 4 fois plus riche en acide tartrique. — 23, sur amidon de pomme de terre au $\frac{1}{20}$ (culture de 10 jours sur porte-objet). — 24, formes observées dans une culture de vingt jours sur liquide de Raulin 10 fois plus riche en acide tartrique. — 25, formes observées sur le sulfate de cuivre à 7 pour 1000, et sur la résorcine à $\frac{1}{100}$. — 26, *Penicillium* après deux passages sur Raulin 10 fois plus riche en acide tartrique.

Fig. 27.— Groupe de conidies d'*Hormodendron*, ensemencé sur porte-objet.

Fig. 28.— Le même, vingt-quatre heures après (température $+12^{\circ}$ à 14°).

Fig. 29.— Thalle provenant d'une conidie bicellulaire, après trois jours de culture.

PLANCHE XVI.

Fig. 30.— Sclérotas à chlamydospores d'une culture d'*Hormodendron* sur Raulin, d'environ trois mois ; *a*, *b*, grandeur naturelle ; *c*, coupe verticale faiblement grossie.

Fig. 31.— Partie de la même coupe, avec chlamydospore, avec divers états, entières et coupées transversalement ; *a*, jeunes chlamydospores ; *b*, une très-grosse chlamydospore, à contenu bosselé avec paroi très-épaissie. Gr. 500.

Fig. 32.— Début de la formation d'un périthèce de *Penicillium*. Les filaments vont à la rencontre l'un de l'autre.

Fig. 33.— Deux filaments venant de s'enrouler l'un autour de l'autre.

Fig. 34 et 35. — Stades plus avancés, avec cloisonnement et brunissement des cellules du périthèce. En *f*, filaments destinés à la cortication.

Fig. 36.— Périthèce mieux formé, avec les deux filaments originels.

Fig. 37.— Deux périthèces, *a*, en coupe transversale; *b*, en coupe verticale. (Gr. 56).

Fig. 38. — Portion de coupe des mêmes périthèces, plus grossie; en *b* les asques viennent de se former; en *a*, les spores sont mises en liberté par destruction des asques.

Fig. 39.— *a*, asques à divers états; *b*, spores libres.

PLANCHE XVII (Gr. 1000).

Fig. 40.— Filaments pris à la périphérie d'une culture sur Raulin; en *c*, on voit un noyau en voie de bipartition, au sommet du filament; en *d*, formation d'un rameau latéral, et première division de son noyau formateur.

Fig. 41.— Noyaux très-inégaux, et en voie de multiplication active, pris dans des cultures cellulaires.

Fig. 42.— Hyphes rampantes dans des cultures âgées de plusieurs jours, sur pain humide.

Fig. 43.— Conidies ayant séjourné cinq mois dans l'eau distillée bouillie, et n'ayant pas germé. On voit dans leur intérieur plusieurs corpuscules, ayant quelquefois remplacé totalement le noyau, et provenant peut-être d'une fragmentation de celui-ci.

Fig. 44.— Epaississement des cloisons et de la paroi des filaments dans les vieilles cultures en milieux liquides.

Fig. 45.— Eléments des mycéliums d'une solution acide de chlorure de baryum. La paroi cellulaire est irrégulièrement épaissie; les noyaux *n* sont peu nombreux, souvent rapprochés deux à deux; *h*, gouttes d'huile.

Fig. 46.— Fragments de la surface d'une culture de trois semaines, sur Raulin additionné de sulfate de cuivre; en *b*, déformation pathologique des conidiophores; on voit dans leur intérieur de nombreux corps colorables, représentant peut-être des noyaux.

Fig. 47.— Conidies mûres. En *c*, on voit à côté du noyau un très-petit corps en croissant.

Fig. 48.— Différentes phases de la germination des conidies sur milieux liquides. En *a*, le noyau de la conidie vient de terminer sa bipartition; en *b* et *c*, germinations plus avancées, avec début de vacuoli-

sation du protoplasme; en *d*, conidie sur le point d'émettre un second tube germinatif : les noyaux placés au centre sont vraisemblablement destinés à ce tube. En *e*, le premier tube émis par la conidie a déjà pris deux cloisons; à son extrémité se voit un très-gros noyau : la conidie commence à former un second filament. En *f*, une seconde hyphe est constituée : il ne reste plus qu'un seul noyau dans la conidie.

Fig 49.— Germinations de trois jours; on voit en *a* des rameaux dont l'un offre près de la base un noyau *n* avec un petit point énigmatique dans son aréole; en *b*, filament à croissance longitudinale très-active, avec de nombreux noyaux en voie de division.

Fig. 50.— Conidiophores à divers états .

a, apparition des bourgeons qui constitueront l'appareil conidien; *b*, *c*, *d*, conidiophores portant des stérigmates jeunes, et qui commencent pour la plupart à se différencier en tête et corps; *e*, *f*, portent des stérigmates ayant déjà produit quelques conidies, dont les plus récemment formées sont encore en place; *g*, division presque complète du noyau central du stérigmate : les conidies 1 et 2 emportent chacune un noyau, provenant d'une division antérieure du noyau central ci-dessus; *h*, stérigmate portant plusieurs conidies. Dans sa tête, on voit les noyaux des deux futures conidies placés l'un au-dessous de l'autre, dans l'ordre de libération des conidies.

NOTES ADDITIONNELLES

I

Pendant l'impression de ce mémoire, nous avons eu connaissance d'un travail de M. Stevens (1) sur l'action de différentes substances sur la germination des spores des champignons. Entre autres espèces, l'auteur a opéré sur le *Penicillium glaucum*, dont il a fait des cultures sur du pain humecté de solutions antiseptiques de titres connus. Les résultats montrent qu'au point de vue pratique il est peu utile de déterminer avec précision les doses antiseptiques, car on ne peut énoncer une donnée numérique qu'en indiquant avec soin les conditions dans lesquelles elle a été obtenue. Ainsi, l'auteur a trouvé que 3 gr., 70 de sublimé pour 50 litres d'eau d'humectation empêchaient le *Penicillium* de germer sur le pain, tandis que sur le liquide de Raulin nous avons trouvé que la dose toxique était entre 1 et 5 grammes. Pour le sulfate de cuivre, il donne 1 gr. 23 par litre comme empêchant la germination, alors que, sur Raulin, nous indiquons plus de 1 pour 100 comme dose critique, et que, sur la macération de blé, Trabut donne 9,5 pour 100.

D'après M. Stevens, le pouvoir toxique des éléments serait d'ordinaire en relation directe avec l'élévation de leur poids moléculaire. Il a constaté, toutefois, que le fait ne se vérifiait pas avec les sels de cuivre. Les résultats que nous avons obtenus pour les sels mercuriques ne cadrent pas non plus avec cette manière de voir. Tout en tenant le plus grand compte des résultats du travail si intéressant et si consciencieux de M. Stevens, nous pensons que de nouvelles recherches seraient nécessaires pour compléter nos connaissances encore bien incomplètes sur ce point.

(1) F.-L. Stevens, *The effect of aqueous solutions upon the germination of fungus spores*. (Botanical Gazette, [Chicago, Illinois], vol. XXVI, Décembre 1898).

L'auteur a constaté, comme nous, que de tous les champignons expérimentés, c'est le *Penicillium* qui s'est montré le plus résistant aux antiseptiques, et que sur certains liquides on peut obtenir simplement des germinations, sans développement ultérieur.

II

Nous donnerons ici les premiers résultats de recherches que nous poursuivons sur le *Coremium vulgare* Corda. Comme on le sait, la forme corémiée du *Penicillium* est beaucoup moins répandue que la forme simple ; c'est pourquoi nous n'avons pu nous la procurer que tardivement.

Il est absolument hors de doute aujourd'hui que le *Coremium vulgare* n'est qu'un état fasciculé du *Penicillium glaucum*. Aussi n'est-ce pas sur ce point qu'ont porté nos recherches. Nous avons seulement étudié la manière dont le *Coremium* se comporte sur les divers milieux nutritifs, et cherché à établir le mécanisme de la corémiation.

Nous avons rencontré cette forme sur du crottin de cheval abandonné sous une cloche depuis une vingtaine de jours ; il s'y est montré à la fin de la fermentation, à peu près en même temps que les *Pilobolus* qui s'y développent d'ordinaire à ce moment. En le cultivant sur divers milieux, nous avons observé les faits suivants :

Sur *Pomme de terre*, notre *Coremium* se conserve pendant deux passages ; dès la troisième transplantation, les buissons n'étaient plus confluent, et, surtout sur les bords, étaient mêlés de beaucoup d'hyphes de *Penicillium*.

Sur *crottin stérilisé*, la culture est vigoureuse et la fasciculation se transmet assez bien pendant plusieurs générations ; cependant, vers le troisième passage, on observe déjà des signes de retour à la forme simple.

Sur *liquide de Raulin*, on obtient dès le second passage (et même en laissant vieillir la première culture), une forme simple dont les thalles, au lieu d'être crustacés comme à l'ordinaire, sont séparés les uns des autres, et enroulés sur eux-mêmes ; les pieds des conidiophores sont seulement plus courts que dans

la forme normale, et les rameaux ont une tendance à se verticiller.

Sur *liquide de Gérard*, à base de lactose et à réaction faiblement alcaline, on conserve le *Coremium* pendant trois passages successifs. Cependant, au troisième repiquage, quelques-uns des cercles concentriques formés par le *Coremium* présentent sur leurs bords de rares pinceaux simples courtement pédiculés, indices d'une tendance au retour vers la forme ordinaire.

Sur *jus de citron*, la forme *Coremium*, dont l'aspect disparaît à mesure que la culture avance en âge, paraît se conserver mieux dans les matras que dans les tubes à essai. Il est possible que l'étendue de la surface du liquide ait une influence, comme on a pu le constater dans la culture d'autres espèces.

Dans les cultures cellulaires sur Raulin et sur jus de citron, nous n'avons pu obtenir que des formes pseudo-corémiées, résultant d'une précoce digitation du conidiophore, dont les branches se terminent alors par des pinceaux divergents courtement pédiculés. Nous n'avons donc pu voir se former sous nos yeux de véritables *Coremium*. Peut-être serons-nous plus heureux en employant d'autres milieux nutritifs : c'est ce que nous apprendra la suite de nos recherches.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,
GUIGNARD.

Vu :

Le Directeur de l'Ecole,
PLANCHON.

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris.
GRÉARD.



INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

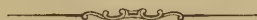
- Agardh (C.-A.).** — *Systema Algarum*. Lundæ, 1824.
- Barnouvin (H.).** — *Organismes des hydrolats et des solutés*. Thèse pour le diplôme de pharmacien supérieur, Paris 1896.
- Bainier (L.).** — Bull. Soc. Bot. Fr., 1880, p. 27.
- Bary (de).** — *Morphologie und Physiologie des Pilze*. Leipzig, 1866.
- Batalin.** — Botan. Jahresb., 1875, p. 226.
- Beauverie (J.).** — Communication à la Soc. Bot. de Lyon, 11 mai 1898.
- Berlèse (A.-N.).** — Bull. Soc. Myc. Fr., VIII, 1892, p. 94. — Ibid, XI, 1895, p. 34.
- Biasoletto.** — *Di alcune alghe microscopiche*. Trieste, 1832.
- Bonorden.** — Bot. Zeitung, 1853, p. 286.
- Bourquelot (Em.).** — Bull. Soc. Myc. Fr., V, 1891, p. 155.
- Boulanger-Dausse.** — J. de Ph. et de Ch., 6^e série, t. V, 1897.
- Brefeld (O.).** — *Zur Entwicklungsgeschichte Des Penicillium*. — Schimmelpilze, II, Leipzig, 1874.
- Brunnengraeber.** — Journ. de Ph. d'Alsace-Lorraine, 1893.
- Corda.** — *Icones fungorum hucusque cognitorum*. Prague, 1837.
- Costantin (J.).** — Revue gén. de Bot., t. V, 1893.
— *Les Mucédinées simples*.
- Dangeard (P.-A.).** — Le Botaniste, VI^e fascicule. Juillet 1897.
- Dubois (Raphaël).** — C. R. Ac. Sc., 1890.
- Duclaux (E.).** — Encycl. chim. de Frémy, t. IX.
- Eidam.** — Cohn's Beiträge zur Biol. der Pflanzen, t. III, fasc. 3, 1883.
- Fries (El.).** — *Systema mycologicum*. Gryphiswald, 1829, t. III, p. 406.
- Gayon (U.).** — *Recherches sur les moisissures des œufs*. Thèse pour le doctorat ès-sciences, Paris, 1875.
- Gérard.** — J. de Ph. et de Ch., 1895.
- Guéguen (F.).** — Bull. Soc. Myc. Fr., XIV, 1898.
- Heim (F.).** — Bull. Soc. Myc. Fr., XI, 1893, p. 231.
- Istvánffi (G. von).** — *Etudes relatives à l'anatomie et à la physiologie des Champignons*. — Budapest, 1891. En magyar, avec résumé français.
— Berichte des Bot. Gesellsch., 1895. Résumé in Ann. Biol. de Delage, 1897, p. 125.
- Léger (M.).** — *Recherches sur la structure des Mucorinées*. Thèse pour le doctorat ès-sciences, Paris, 1895.
- Léveillé.** — Sur les Sclerotium. (Ann. Sc. Nat. Bot., 1840).
- Lendner (A.).** — *Variations de quelques Champignons sous l'influence des conditions de milieu*. Thèse pour le doctorat ès-sciences, Genève, 1897.
- Löw (E.).** — Pringsheim. Jahrbuch, L. VII, 4^e livr., 1870.

- Laurent (E.).** — Ann. Inst. Pasteur, 1888.
- Marchand (L.).** — C. R. Ac. Sc. Novembre 1898. *Botanique cryptogamique*, 1883, p. 187.
- Ménier (Ch.).** — J. de Ph. et de Ch., 1891, p. 442.
- Nägeli.** — *Untersuchungen über niedere Pilze*. Munich, 1882.
- Pasteur (L.).** — *Etudes sur la bière*. Paris, 1873.
- Persoon.** — *Synopsis methodica fungorum*. Göttingen, 1801.
- Petrowski.** — Protocoll. des Sitz. der Gesellsch. zur Erforsch. des Gouvern. Jaroslaw in Natural. Hinsicht, 1875. Résumé dans Bot. Jahresbericht, 1875.
- Planchon (L.).** — J. de Ph. et de Ch., 1898.
- Raulin (J.).** — *Etudes chimiques sur la végétation. Recherches sur le développement d'une Mucédinée dans un milieu artificiel*. (Thèse Fac. Sc. Paris, 1870).
- Ravaz et Gouirand.** — Revue de Viticulture, t. VII, n° 170. Mars 1897.
- Ray (J.).** — *Variations des champignons inférieurs sous l'influence du milieu*. (Thèse Fac. Sc. Paris, 1897).
- Riess (H.).** — Bot. Zeitung, 1853, p. 134.
- Saccardo (P.-A.).** — *Sylloge fungorum*, t. IV, 1886.
- Schmitz.** — Verhandl. der Naturhistor. vereines der Preussischen Rheinlande, Bonn, 1879.
- Seynes (J. de).** — *Recherches sur les Champignons inférieurs*, 1874. Fascicule III. — Bull. Soc. Bot. Fr., 9 février 1872. — C. R. Ac. Sc., 21 avril 1879. — Bull. Soc. Bot. Fr., 12 et 26 juillet 1895.
- Stevens (F.-L.).** — Botanical Gazette, Chicago (Illinois), vol. XXVI, Décembre 1898.
- Strasburger (A.).** — *Das Botanische Prakticum*, Iena, 1884, p. 429.
- Stuart (E.-B.).** — Proceedings of Illinois Pharm. Association. (Résumé dans J. de Ph. et de Ch., 1887).
- Tanret (L.).** — J. de Ph. et de Ch., 1897.
- Tieghem (Van).** — Ann. Sc. Nat., 1876, p. 322. — Bull. Soc. Bot. Fr., 1877 p. 163. — Ibid., 1881, p. 137.
- Trabut (L.).** — Bull. Soc. Bot. Fr., Janvier 1895.
- Trécul.** — C. R. Ac. Sc., t. LXXIII, p. 1454.
- Tulasne.** — *Selecta fungorum carpologia*, t. I, p. 227.
- Vuillemin (P.).** — Bull. de la Soc. des Sc. naturelles de Nancy, série II, t. VIII, fasc. XX, 1886.
- Wèvre (A. de).** — Bull. de la Soc. Roy. de Bot. de Belgique, 1891.
- Zukal.** — Sitzungsber. der Kais. Akad. der Wiss. Wien, 1887, p. 175.



TABLE

Introduction.....	1
I. — Technique générale.....	3
II. — Morphologie et nature des mycéliums de quelques solutions.....	7
III.— Variations dans le développement du <i>Penicillium glaucum</i> et de l' <i>Hormodendron</i> des solutions.....	21
IV.— Influence de quelques substances sur le <i>Penicillium glaucum</i>	41
V. — Action de divers antiseptiques sur le <i>Penicillium glaucum</i>	52
VI.— Recherches cytologiques sur le <i>Penicillium glaucum</i>	60
VII.— Conclusions générales.....	71
Explication des planches.....	73
Notes additionnelles.....	77
Index bibliographique.....	81

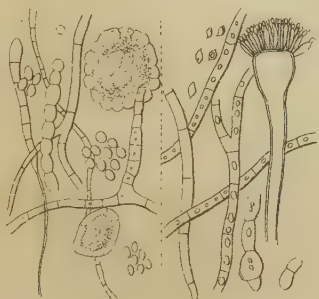




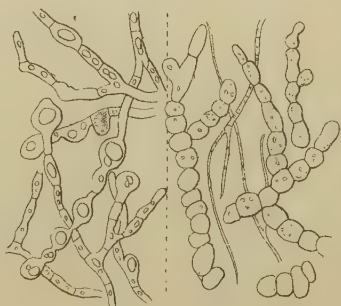
3



4



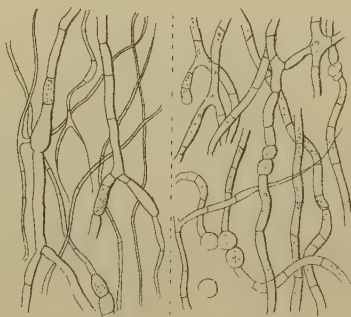
5



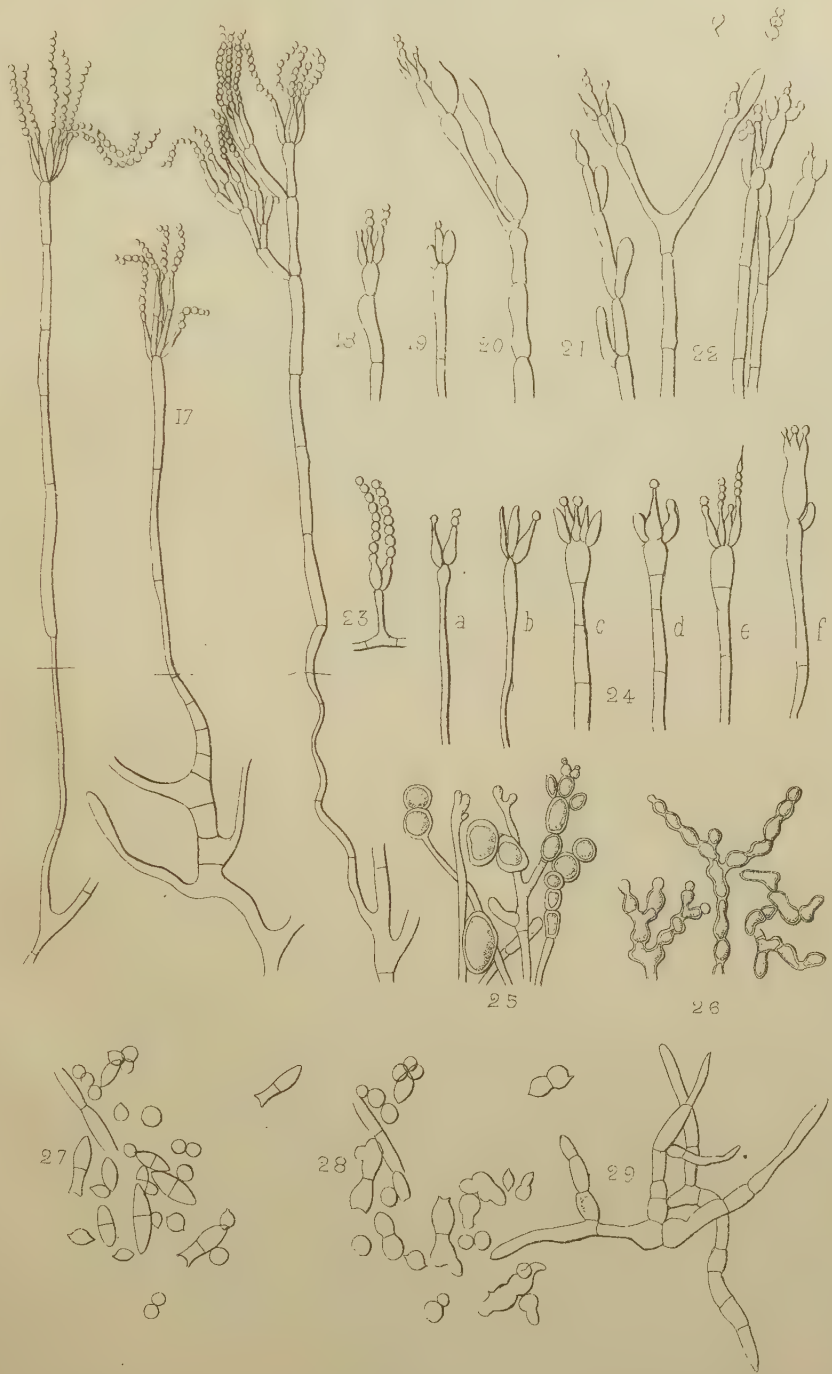
6



7

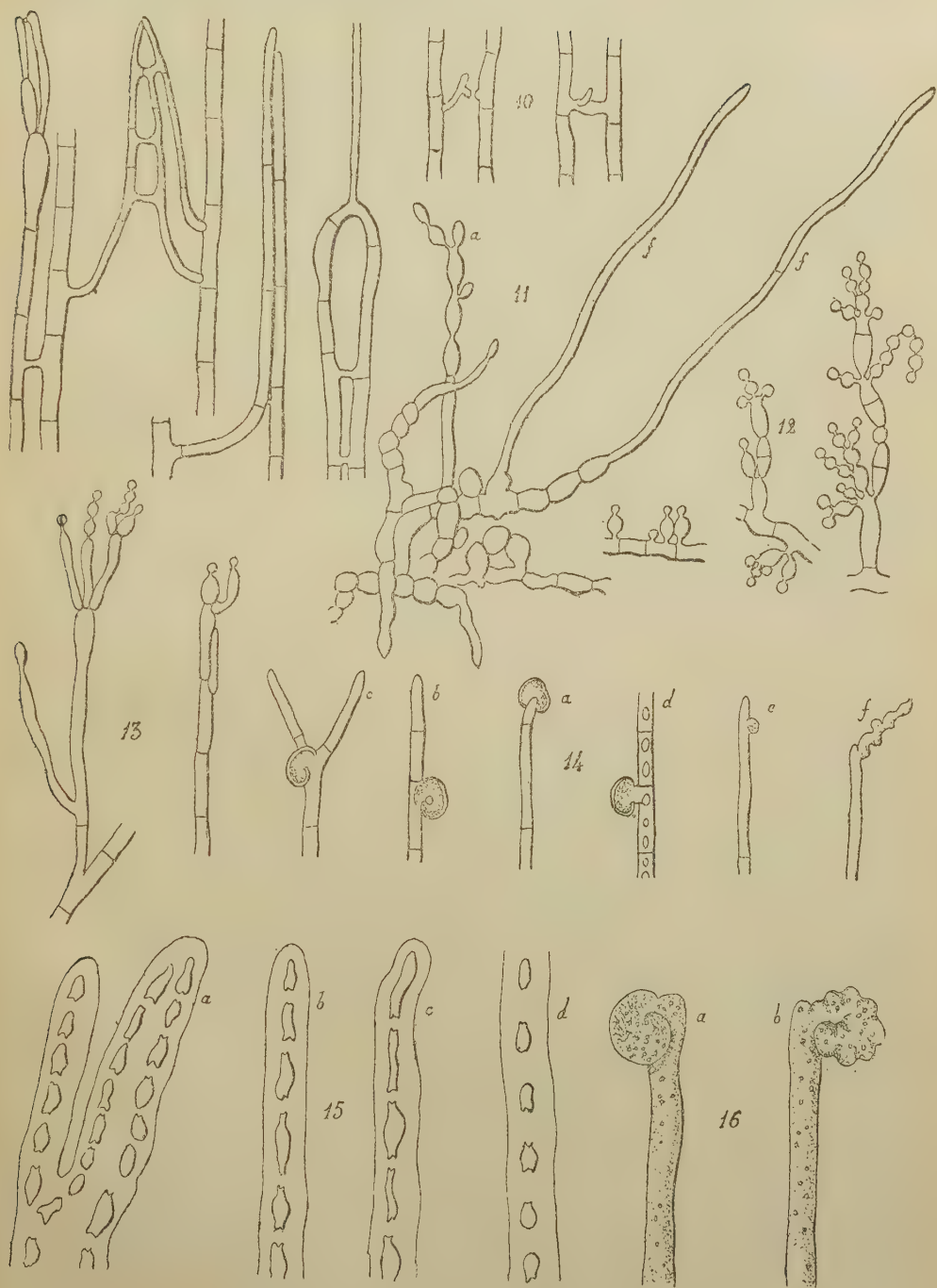


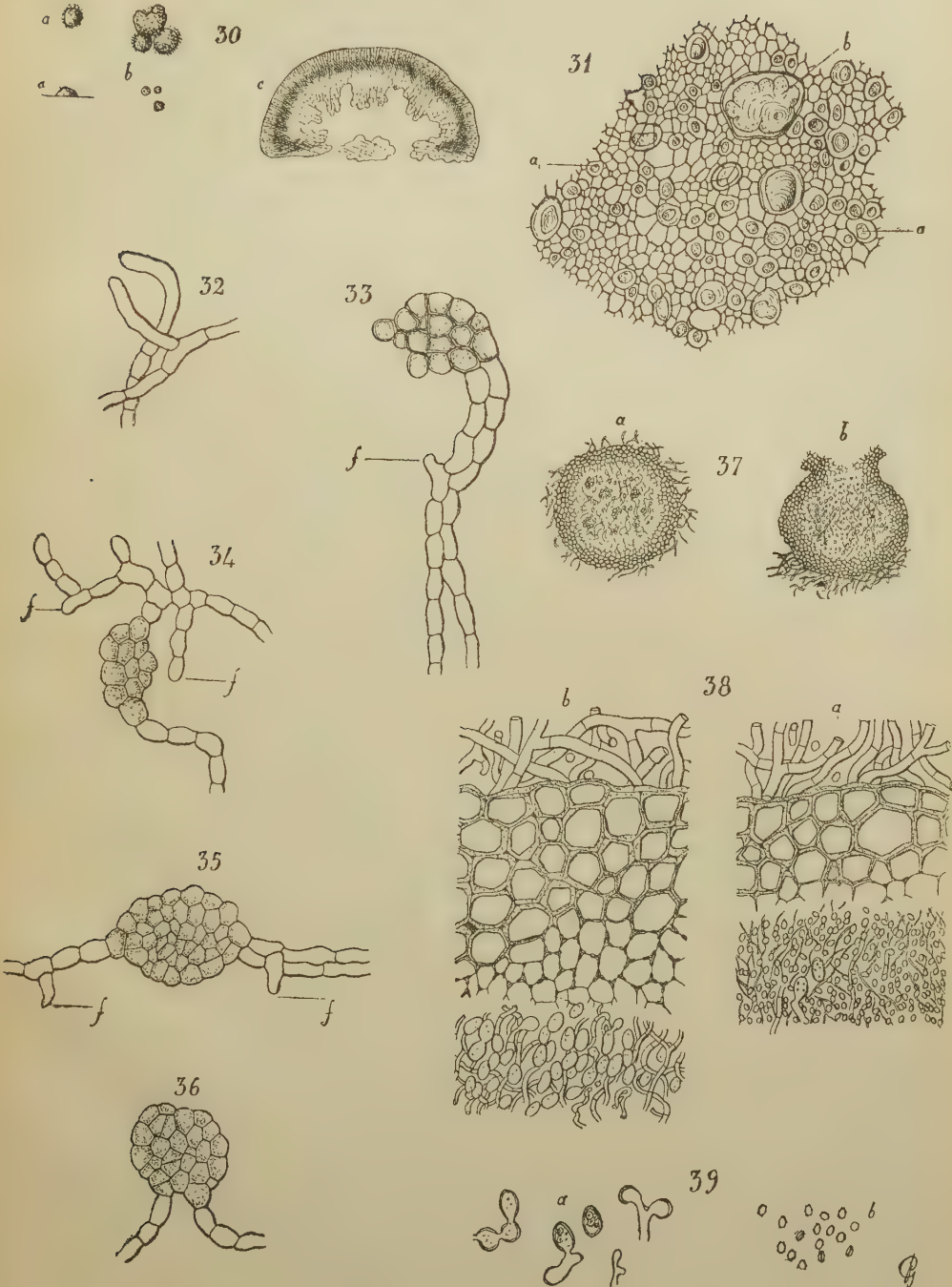
8

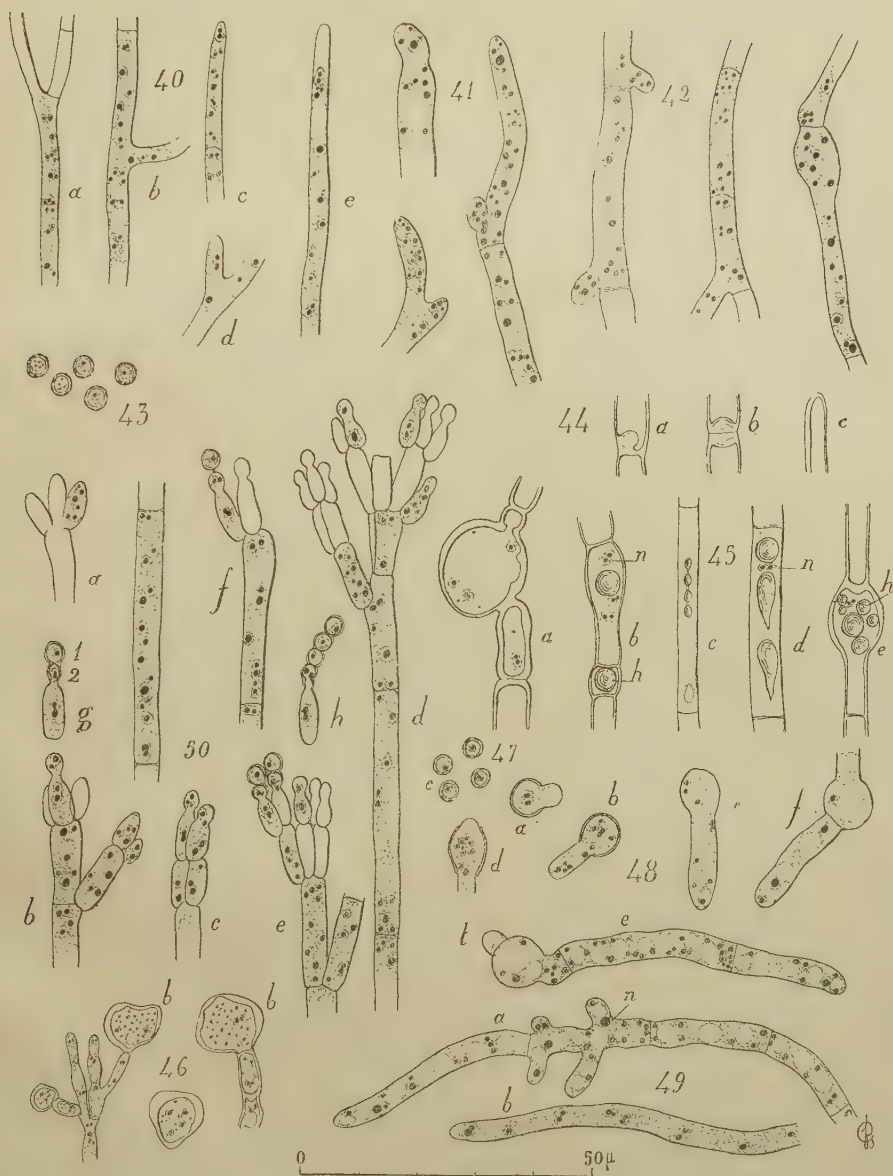


Guéguen del.

M de Jæghen lith.







Guéguen del.

